

Polyamine: Analyse, Vorkommen und Einfluß auf die Methylierung von Transfer-Ribonukleinsäuren

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Michael Mach
aus Coburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Polyamine: Analyse, Vorkommen und Einfluß auf die Methylierung von Transfer-Ribonukleinsäuren

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Michael Mach
aus Coburg



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.1981

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Wegener

Erstberichterstatte: Prof. Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatte: Prof. Dr. O. Dann

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Chemie/Biologie
an der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	2
3.	Methoden und Ergebnisse	3
3.1.	Methoden	3
3.2.	Ergebnisse	3
4.	Diskussion und Zusammenfassung	4
4.1.	Diskussion	4
4.2.	Zusammenfassung	4
5.	Für meine Eltern	5
5.1.	Einleitung	5
5.2.	Methoden	5
5.3.	Ergebnisse	5
5.4.	Diskussion	5
5.5.	Zusammenfassung	5
6.	Literaturverzeichnis	6
7.	Anhang	7
7.1.	Einleitung	7
7.2.	Methoden	7
7.3.	Ergebnisse	7
7.4.	Diskussion	7
7.5.	Zusammenfassung	7
8.	Fazit	8
9.	Danksagung	9
10.	Index	10
11.	Abkürzungen	11
12.	Quellenverzeichnis	12
13.	Lebenslauf	13
14.	Curriculum Vitae	14
15.	Erklärung	15
16.	Zeugnis	16
17.	Bestätigung	17
18.	Erklärung	18
19.	Zeugnis	19
20.	Bestätigung	20
21.	Erklärung	21
22.	Zeugnis	22
23.	Bestätigung	23
24.	Erklärung	24
25.	Zeugnis	25
26.	Bestätigung	26
27.	Erklärung	27
28.	Zeugnis	28
29.	Bestätigung	29
30.	Erklärung	30
31.	Zeugnis	31
32.	Bestätigung	32
33.	Erklärung	33
34.	Zeugnis	34
35.	Bestätigung	35
36.	Erklärung	36
37.	Zeugnis	37
38.	Bestätigung	38
39.	Erklärung	39
40.	Zeugnis	40
41.	Bestätigung	41
42.	Erklärung	42
43.	Zeugnis	43
44.	Bestätigung	44
45.	Erklärung	45
46.	Zeugnis	46
47.	Bestätigung	47
48.	Erklärung	48
49.	Zeugnis	49
50.	Bestätigung	50
51.	Erklärung	51
52.	Zeugnis	52
53.	Bestätigung	53
54.	Erklärung	54
55.	Zeugnis	55
56.	Bestätigung	56
57.	Erklärung	57
58.	Zeugnis	58
59.	Bestätigung	59
60.	Erklärung	60
61.	Zeugnis	61
62.	Bestätigung	62
63.	Erklärung	63
64.	Zeugnis	64
65.	Bestätigung	65
66.	Erklärung	66
67.	Zeugnis	67
68.	Bestätigung	68
69.	Erklärung	69
70.	Zeugnis	70
71.	Bestätigung	71
72.	Erklärung	72
73.	Zeugnis	73
74.	Bestätigung	74
75.	Erklärung	75
76.	Zeugnis	76
77.	Bestätigung	77
78.	Erklärung	78
79.	Zeugnis	79
80.	Bestätigung	80
81.	Erklärung	81
82.	Zeugnis	82
83.	Bestätigung	83
84.	Erklärung	84
85.	Zeugnis	85
86.	Bestätigung	86
87.	Erklärung	87
88.	Zeugnis	88
89.	Bestätigung	89
90.	Erklärung	90
91.	Zeugnis	91
92.	Bestätigung	92
93.	Erklärung	93
94.	Zeugnis	94
95.	Bestätigung	95
96.	Erklärung	96
97.	Zeugnis	97
98.	Bestätigung	98
99.	Erklärung	99
100.	Zeugnis	100
101.	Bestätigung	101
102.	Erklärung	102
103.	Zeugnis	103
104.	Bestätigung	104
105.	Erklärung	105
106.	Zeugnis	106
107.	Bestätigung	107
108.	Erklärung	108
109.	Zeugnis	109
110.	Bestätigung	110
111.	Erklärung	111
112.	Zeugnis	112
113.	Bestätigung	113
114.	Erklärung	114
115.	Zeugnis	115
116.	Bestätigung	116
117.	Erklärung	117
118.	Zeugnis	118
119.	Bestätigung	119
120.	Erklärung	120
121.	Zeugnis	121
122.	Bestätigung	122
123.	Erklärung	123
124.	Zeugnis	124
125.	Bestätigung	125
126.	Erklärung	126
127.	Zeugnis	127
128.	Bestätigung	128
129.	Erklärung	129
130.	Zeugnis	130
131.	Bestätigung	131
132.	Erklärung	132
133.	Zeugnis	133
134.	Bestätigung	134
135.	Erklärung	135
136.	Zeugnis	136
137.	Bestätigung	137
138.	Erklärung	138
139.	Zeugnis	139
140.	Bestätigung	140
141.	Erklärung	141
142.	Zeugnis	142
143.	Bestätigung	143
144.	Erklärung	144
145.	Zeugnis	145
146.	Bestätigung	146
147.	Erklärung	147
148.	Zeugnis	148
149.	Bestätigung	149
150.	Erklärung	150
151.	Zeugnis	151
152.	Bestätigung	152
153.	Erklärung	153
154.	Zeugnis	154
155.	Bestätigung	155
156.	Erklärung	156
157.	Zeugnis	157
158.	Bestätigung	158
159.	Erklärung	159
160.	Zeugnis	160
161.	Bestätigung	161
162.	Erklärung	162
163.	Zeugnis	163
164.	Bestätigung	164
165.	Erklärung	165
166.	Zeugnis	166
167.	Bestätigung	167
168.	Erklärung	168
169.	Zeugnis	169
170.	Bestätigung	170
171.	Erklärung	171
172.	Zeugnis	172
173.	Bestätigung	173
174.	Erklärung	174
175.	Zeugnis	175
176.	Bestätigung	176
177.	Erklärung	177
178.	Zeugnis	178
179.	Bestätigung	179
180.	Erklärung	180
181.	Zeugnis	181
182.	Bestätigung	182
183.	Erklärung	183
184.	Zeugnis	184
185.	Bestätigung	185
186.	Erklärung	186
187.	Zeugnis	187
188.	Bestätigung	188
189.	Erklärung	189
190.	Zeugnis	190
191.	Bestätigung	191
192.	Erklärung	192
193.	Zeugnis	193
194.	Bestätigung	194
195.	Erklärung	195
196.	Zeugnis	196
197.	Bestätigung	197
198.	Erklärung	198
199.	Zeugnis	199
200.	Bestätigung	200

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Zusammenfassung</u>	1
2.	<u>Einleitung</u>	4
3.	<u>Material und Methoden</u>	16
3.1.	Chemikalien	16
3.2.	Polyaminanalyse	16
3.3.	Wachstums- und Differenzierungsbedingungen für Dictyostelium disc.	22
3.3.1.	Entwicklung auf Filtern	22
3.3.2.	Markierung der tRNA	23
3.3.3.	Züchtung in phosphatarmem Medium	23
3.4.	Präparation von Gesamt-tRNA	23
3.4.1.	Präparation von tRNA aus vegetativen Zellen	23
3.4.2.	Isolierung von tRNA aus Zellen des "mexican hat" Stadiums	24
3.4.3.	Gelchromatographie von tRNA an Sephadex G 100	25
3.5.	Entsalzen von tRNA-haltigen Lösungen	26
3.6.	tRNA-freie Enzymextrakte aus Dictyostelium disc.	27
3.7.	Methylierung von tRNA	28
3.8.	Beusteinanalyse von tRNA	29
3.9.	Zweidimensionale Gelelektrophorese von tRNA	31
3.10.	Quantitative Analyse von RNA, Protein und Polyaminen in Zellextrakten	31
4.	<u>Resultate</u>	34
4.1.	Analyse der freien Polyamine	34
4.1.1.	Erarbeitung von Bedingungen zur Analyse freier und acetylierter Polyamine	39
4.2.	Qualitative und quantitative Analyse von Polyaminen in verschiedenen Organismen	52

4.2.1.	Prokaryonten (<i>Bacillus subtilis</i>)	52
4.2.2.	Niedere Eukaryonten (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	55
4.2.3.	Polyaminspiegel im menschlichen Urin	57
4.3.	S-Adenosylmethionin-abhängiger Stoffwechsel von Polyaminen in <i>Dictyostelium disc.</i>	60
4.3.1.	Polyaminspiegel	61
4.3.2.	Entstehung von 1,3 Diaminopropan aus Spermidin	69
4.4.	S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung von tRNA in <i>Dictyostelium discoideum</i>	73
4.4.1.	Trennung spezifischer tRNAs	74
4.4.2.	Neusynthese und Methylierung von tRNA zu bestimmten Entwicklungsphasen	74
4.4.3.	Neusynthese spezifischer methylierter Nukleoside	76
4.5.	Polyamine und tRNA-Methyltransferaseaktivitäten in <i>Dictyostelium disc.</i>	84
4.5.1.	Einfluß von Polyaminen auf die Gesamt-tRNA Methyltransferaseaktivität in vitro	84
4.5.2.	Methylierung spezifischer Nukleoside mit Enzym-extrakten aus vegetativer Wachstumsphase und Entwicklung	96
4.6.	Einfluß von Polyaminen auf die tRNA-Methyltransferasen in <i>Dictyostelium</i>	98
4.6.1.	Hemmung der Synthese von Putrescin, Spermidin und Diaminopropan	98
4.6.2.	Hemmung der Polyaminsynthese durch α -Methyl-Ornithin	99
4.6.3.	Hemmung der Polyaminsynthese durch 1,3 Diaminopropan-(2)-ol	103
4.6.4.	Synthese und Methylierung von Gesamt-RNA unter Polyaminmangel	103
4.6.5.	Synthese und Methylierung von Gesamt-tRNA unter Polyaminmangel	106

4.6.6.	Methylierung spezifischer Nukleoside der tRNA unter Polyaminmangel	106
4.7.	Charakterisierung von zwei unbekannten markierten Nukleosiden (N_1 und N_2)	110
4.7.1.	Synthese von N_1 und N_2 während der Entwicklung von Dictyostelium disc.	123
4.8.	Einfluß von 1,3 Diaminopropanol auf die Sporen- bildung von Dictyostelium disc.	123
5.	Diskussion	127

Abkürzungen

A	Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
1 A ₂₆₀ Einheit	RNA-Menge, die in 1 ml Wasser gelöst bei 260 nm und 1 cm Lichtweg eine Absorption von 1 ergibt (= 44 ug RNA)
ATP	Adenosintriphosphat
B-ME	2-Mercapto-äthanol
C	Cytidin
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DAP	1,3 Diaminopropan
DAP-OH	1,3 Diaminopropan-2-ol
DEAE	Diäthylaminoäthyl
Dimethyl-POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyl-oxazol)-benzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
M	molar
Modifizierte Nukleoside	
m ¹ A	1-Methyladenosin
t ⁶ A	N-(N-(9-β-D-Ribofuranosylpurin-6-yl)carbamoyl)threonin
m ³ C	3-Methylcytidin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
Cm	2'-O-Methylcytidin
D	Dihydrouridin
m ¹ G	1-Methylguanosin
m ² G	2-Methylguanosin
m ⁷ G	7-Methylguanosin
m ² ₂ G	N ² ,N ² -Dimethylguanosin
Gm	2'-O-Methylguanosin

I	Inosin
∅	Pseudouridin
m ⁵ U, rT	Ribothymidin
Tm	2'-O-Methylribothymidin
Um	2'-O-Methyluridin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ODC	Ornithindecaboxylase
Poly-Phe	Polyphenylalanin
Put	Putrescin
RNAase	Ribonuklease
RPC	Reversed Phase Chromatography
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Sedimentationseinheit
S-30	Überstand nach Zentrifugation des Zellsaftes mit 30 000 x g
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMDC	S-Adenosylmethionin-decarboxylase
SDS	Na-Dodecylsulfat
Sp	Spermin
Spd	Spermidin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil
UV	Ultraviolett

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen und den Konzentrationen der aliphatischen Polyamine und der Methylierung von Transfer-Ribonukleinsäuren in *Dictyostelium discoideum* untersucht. Im wesentlichen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- A) Für die quantitative Bestimmung der Di- und Polyamine 1,3 Diaminopropan, Putrescin, Spermidin und Spermin sowie der Derivate Acetylputrescin und Acetylspermidin wurde erstmals eine routinemäßig brauchbare Methode entwickelt. Die Substanzen werden in einem Analysenschritt an einem Kationenaustauscherharz mit einem NaCl/Na-citrat Puffersystem getrennt und durch Reaktion mit o-Phtaldialdehyd nachgewiesen. Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Picomol-Bereich. Eine Reinigung der Proben von Aminosäuren und Aminen ist nicht erforderlich. Bei Verwendung eines automatischen Aminosäureanalysators können etwa 10 Proben pro Tag untersucht werden. Die Methode wurde für die Bestimmung der Polyamine in Zellextrakten von Pro- und Eukaryonten und menschlichem Urin eingesetzt.
- B) Durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurde Gesamt-tRNA aus *Dictyostelium discoideum* in etwa 40 Flecken getrennt. Im Rahmen des Auflösungsvermögens der Methode konnten keine Unterschiede zwischen Gesamt-tRNA aus der vegetativen Wachstumsphase und dem Preaggregationsstadium festgestellt werden. Während der ersten 12 Stunden Entwicklung werden alle trennbaren tRNA-Spezies neu synthetisiert und auch methyliert. Die Synthesen der methylierten Nukleoside der tRNA zeigen deutliche Unterschiede in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Im späten Stadium werden größere Mengen 2'-O-methyl-Ribothymidin (Tm) synthetisiert. Der prozentuale Anteil von Tm in der tRNA steigt von 0.6% in der Preaggregationsphase auf 10% in der späten Entwicklung. Einige andere Nukleoside zeigen ebenfalls unterschiedliche

Verteilungen.

- C) In *Dictyostelium disc.* wurden die Polyamine 1,3 Diaminopropan, Putrescin und Spermidin nachgewiesen. Die Konzentrationen betragen im vegetativen Wachstumsstadium 7.0 mM (DAP), 10.6 mM (Put), 1.6 mM (Spd). Das Verhältnis der Polyamine in Bezug auf Protein ist während des vegetativen Wachstums konstant. Während der ersten 8 Stunden der Preaggregation sinken die Konzentrationen - bezogen auf Protein - auf etwa 40 - 50%.
- D) Die enzymatische in vitro Methylierung von *E. coli* Gesamt-tRNA mit Enzymextrakten aus *Dictyostelium* zeigt eine strenge Abhängigkeit von der Art und der Konzentration des Polyamins im Ansatz. Optimale Methylgruppeninkorporation wurde im Bereich der physiologischen Putrescin- und Spermidinkonzentrationen gemessen (10 mM Put, 1 - 2 mM Spd). Diaminopropan zeigt keinen ausgeprägten Effekt auf die Reaktion. Enzymextrakte aus Zellen der vegetativen Wachstumsphase und dem Preaggregationsstadium haben die gleiche Polyaminabhängigkeit. Sie zeigen jedoch deutliche Unterschiede in den Verhältnissen der gebildeten Produkte. Enzymextrakte aus *B. subtilis* lassen sich ebenfalls durch physiologische Polyaminkonzentrationen optimal stimulieren. Die Wirkung der Polyamine scheint auf einem spezifischen Effekt der Polyamine an den methylierenden Enzymen zu beruhen.

Die Hemmung der Polyaminsynthese in vegetativ wachsenden *Dictyostelium* Zellen führt zu einer Untermethylierung von tRNA. Zwei strukturell verschiedene Hemmstoffe - α -Methyl-Ornithin und 1,3 Diaminopropan-(2)-ol - zeigen das gleiche Ergebnis. Die Polyaminspiegel in den Zellen korrelieren mit dem Ausmaß der Untermethylierung der tRNA. Bei totaler Blockierung der Polyaminsynthese werden tRNAs synthetisiert, die nur noch 50% der Methylgruppen tragen. Zwei Nukleoside wurden gefunden, deren Bildung absolut abhängig ist von

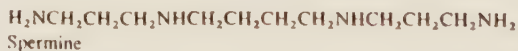
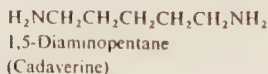
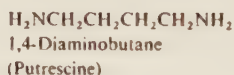
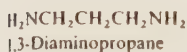
der physiologischen Polyaminkonzentration. Die Nukleoside sind durch Methyl- ^3H -Methionin, Methyl- ^3H -S-Adenosylmethionin und ^3H -Cytidin markierbar. Ihr chromatographisches Verhalten bei der HPLC-Analyse entspricht den Nukleosiden Adenosin und Guanosin. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um die Hauptbasen oder um modifizierte Nukleoside handelt.

Nach den Befunden dieser Arbeit scheint eine kausale Abhängigkeit zu bestehen zwischen dem Polyaminspiegel in der Zelle und der Methylierung der tRNA.

Die in der Literatur berichteten Veränderungen der Methylierungsmuster von tRNA und der Polyaminspiegel in differenzierendem und neoplastischem Gewebe könnten demnach in einem direkten Zusammenhang stehen.

2. Einleitung

Die Polyamine Putrescin, Spermidin, Spermin und Cadaverin sind basische aliphatische Amine, die in allen bisher untersuchten lebenden Organismen gefunden wurden. Obwohl die Entdeckung des Spermidins durch Leeuwenhock auf das Jahr 1677 zurückgeht, ist die systematische Erforschung ihrer Wirkungen erst möglich, seit die komplexen Strukturen von Nukleinsäuren und Proteinen bekannt sind. Die Strukturen der wichtigsten Polyamine sind in Abb. 2.1. gezeigt.



Putrescin und Spermidin sind Bestandteile niederer und höherer Organismen. Cadaverin kommt nur in Prokaryonten vor, während Spermin bisher nur in Eukaryonten gefunden wurde. Diaminopropan wurde gelegentlich in Mikroorganismen entdeckt (Tabor und Tabor 1976).

Die hauptsächlichen Vorläufer der Polyamine in der Zelle sind L-Methionin und L-Ornithin.

Ornithin wird durch Decarboxylierung direkt in Putrescin umgewandelt. Methionin wird mit Hilfe von ATP zu S-Adenosylmethionin aktiviert, welches als Donor des Propylaminrestes für die Synthese der höheren Polyamine

benutzt wird (Abb. 2.2.). In Bakterien gibt es einen zweiten, untergeordneten Syntheseweg für Putrescin: Arginin kann zu Agmatin decarboxyliert werden, welches unter Harnstoffabspaltung Putrescin liefert.

Einige an der Polyaminsynthese beteiligten Enzyme zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus. Die Ornithin-decarboxylase (ODC) kontrolliert durch ihre niedrige basale Aktivität die Syntheserate der Polyamine (Raina et al. 1973). Durch verschiedenste Induktoren kann die Aktivität auf das 600 - 700fache gesteigert werden (Hogan et al. 1973). Die ODC hat die kürzeste Halbwertszeit, die für ein Enzym gemessen wurde. In HeLa Zellen werden als niedrigste Werte 11 Minuten angegeben (Canellakis et al. 1978).

An der Synthese des Spermidins und des Spermins ist eine weitere Decarboxylase beteiligt: die S-Adenosylmethionin-decarboxylase (SAMDC). Auch dieses Enzym besitzt eine kurze Halbwertszeit (Eloranta et al. 1976). SAMDC aus Rattenleber wird in vitro durch Putrescin stimuliert (Änderung des K_m -Wertes) und durch Spermin gehemmt (Änderung von V_{max}) (Sakai et al. 1979). Die Induzierbarkeit des Enzyms ist nicht so ausgeprägt wie bei der Ornithin-decarboxylase.

Die beiden Propylamintransferasen (Spermidin- und Spermin-Synthetasen) sind stabile Enzyme mit normalen Halbwertszeiten (Hannonen et al. 1972).

Über den Metabolismus der Polyamine ist noch wenig bekannt. In Bakterien kann Spermidin in 1.3 Diaminopropan und β -Aminopropionaldehyd gespalten werden (Cashel et al. 1970). In der Rattenleber können nach Hölltä die höheren Homologen durch eine Polyaminoxidase ineinander umgewandelt werden. Das Enzym kann Spermin in Spermidin und β -Aminopropionaldehyd und Spermidin in Putrescin und β -Aminopropionaldehyd zerlegen. Seiler hat beschrieben, daß

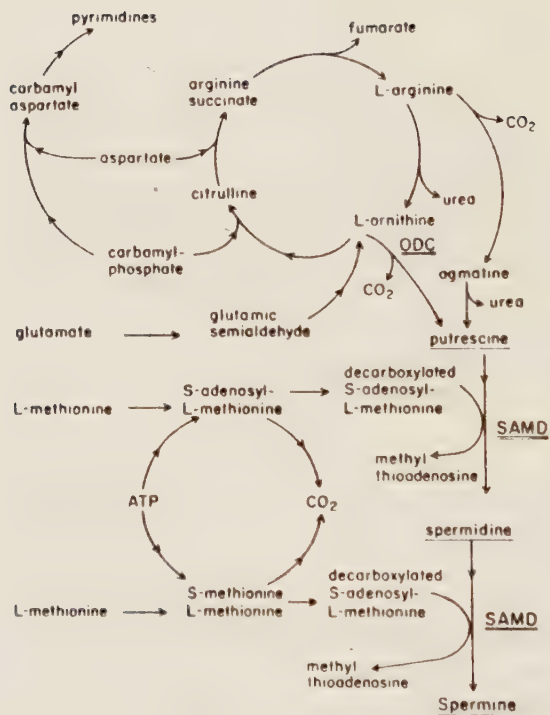


Abb. 2.2. Biosynthese der Polyamine (Russel 1973).

Putrescin nach der Umwandlung in Acetylputrescin, Substrat für eine Monoaminoxidase sein kann (Seiler und Al-Therib 1974).

Bei physiologischem pH liegen die Polyamine als Kationen vor und können deshalb über Ionenbindungen an Nukleinsäuren, Proteine und Phospholipide, die negativ geladene Gruppen tragen, gebunden werden. Sie können Wasserstoffbrücken bilden und durch den aliphatischen Teil des Kohlenwasserstoffgerüsts hydrophobe Wechselwirkungen z.B. mit Membranen eingehen. Auf Grund dieser Eigenschaften sind eine große Anzahl von biologischen Funktionen der Polyamine vorgeschlagen worden (Abb. 2.3.).

Die ersten Hinweise für eine Assoziation von Polyaminen mit Nukleinsäuren wurden in dem *Escherichia coli* Phagen T₄ gefunden. Die DNA dieser Phagen enthält Polyamine in einer Menge, die 40% der Phosphatreste neutralisieren können (Ames und Dubin 1960).

Die Funktion von Spermidin an der DNA besteht in einem Schutz gegen enzymatische Hydrolyse (Krupp 1979) und der Stabilisierung der Tertiärstruktur. Unter Spermidinzusatz kann die DNA aus *E. coli* in einer stark gefalteten Form isoliert werden, von der angenommen wird, daß sie der nativen Konfiguration des bakteriellen Chromosoms ähnlich ist (Tabor und Tabor 1976).

Polyamine beeinflussen ebenfalls eine Reihe von Reaktionen, die die Ribonukleinsäuren und die Translation der mRNA betreffen. Durch den Zusatz von 1mM Spermidin und 8 mM Putrescin zu einem zellfreien *E. coli* Proteinbiosynthesystem mit Poly-Uridin als synthetischem Messenger kann der Fehleinbau von Leucin gegenüber Phenylalanin von 1:1000 auf 1: 10 000 verringert werden (Jelenc und Kurland 1979). Bei der Translation großer natürlicher messenger RNAs kann durch den Zusatz von Spermidin der Anteil von vorzeitig abgebrochenen Proteinketten drastisch verringert werden (Abraham und Pihl 1980).

1. *Polyamines as growth factors*
 - In microorganisms
 - In mammalian cells
2. *Stabilization of whole cells and membranes*
3. *Stabilization of subcellular particles*
4. *Association with nucleic acids*
 - Stabilization of DNA against denaturation
 - Association with tRNA
 - Stabilization of folded form of DNA
 - Packing of DNA in bacteriophages
 - Stimulation of DNA synthesis
 - Stimulation of RNA synthesis
 - Modification of the activity of ribonucleases
 - Stabilization of newly synthesized RNA
5. *Effects on protein synthesis*
 - Binding of tRNA molecules to ribosomes
 - Stimulation of tRNA methylation
 - Replacement of Mg^{++} in aminoacyl tRNA synthetase reaction
 - Association with ribosomes
 - Biogenesis of ribosomal particles
 - Fidelity of translation
 - Initiation of translation
 - Stimulation of tRNA nucleotidyltransferase
6. *Effects on various metabolic reactions*
 - Stimulation of nucleotide kinases
 - Modification of protein kinase activities
 - Enhancement of ADP-ribosylation of nuclear proteins
 - Activation of phosphorylase b
 - Stimulation of lipolysis
 - Activation of choline kinase
 - Enhancement of fructose utilization in epididymal spermatozoa
 - Inhibition of ATPase
 - Modification of acetylcholine esterase activity
 - Inhibition of platelet aggregation
 - Stimulation of metabolism of estradiol in liver microsomes
7. *Pharmacologic effects in whole animals*
 - Nephrotoxic effects
 - Hypothermic and sedative effect

Abb. 2.3.

Biologische Aktivitäten der Polyamine (Jänne et al. 1978).

Transfer Ribonukleinsäuren aus *Escherichia coli*, die unter schonenden Bedingungen isoliert werden, enthalten 2 Mol Spermidin pro Mol tRNA (Cohen et al 1969). Wenn tRNA aus Säugerzellen unter den gleichen Bedingungen isoliert wird, enthält sie ein Gemisch aus Spermidin und Spermin. Daß diese Stöchiometrie auch eine physiologische Bedeutung hat, zeigen Strukturanalysen von Quigley (1978) (Abb. 2.4.).

Danach gelingt die Kristallisation von Phenylalanin-spezifischer tRNA (tRNA^{Phe}) nur in Gegenwart von Spermin oder Spermidin. An jedem Molekül tRNA finden sich dann zwei Moleküle Spermin und 4 Mg²⁺ Ionen. Es wird diskutiert, daß ein Spermin für die Trennung der beiden negativen Phosphatgerüste der tRNA wichtig sei und ein zweites Spermin die Konformation des Anticodons beeinflusst. Die exakte Ausrichtung des Anticodons spielt eine entscheidende Rolle bei der Funktion der tRNA am Ribosom.

Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) bilden die Adapter-moleküle, die in der Proteinsynthese an der Übersetzung der Nukleotidsequenz der DNA in die Aminosäuresequenz der Proteine beteiligt sind. Neben ihrer Rolle in der Proteinsynthese haben tRNAs noch eine Reihe von anderen Funktionen in der Zelle, z.B. bei der Zellwandsynthese, bei der Regulation von Enzymaktivitäten und Genaktivitäten (Clark 1978).

Bei der Betrachtung der Strukturen von verschiedenen tRNA-Molekülen fällt auf, daß bestimmte Basenpositionen im Verlauf der Evolution konserviert wurden. Außerdem enthalten tRNAs als einzige Nukleinsäuren zahlreiche modifizierte, vor allem methylierte Nukleoside. Diese Nukleoside können hauptsächlich nach zwei Merkmalen unterschieden werden:

- (i) Sequenzspezifische Modifikationen
- (ii) Positionsspezifische Modifikationen.

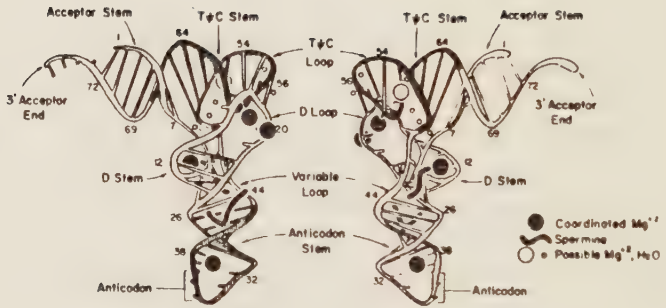


Abb. 2.4.

Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von Phenylalanin-spezifischer tRNA aus Hefe und ihrer assoziierten Kationen (Quigley et al. 1978).

Modifikationen, die spezifisch sind für eine bestimmte Sequenz, findet man zum Beispiel in Phenylalaninspezifischen tRNAs aus Eukaryonten. Diese Moleküle enthalten in der Anticodonschleife die Sequenz A-C_m-U-G_m-A. Daneben gibt es eine größere Anzahl von spezifischen Positionen innerhalb verschiedener tRNAs, die modifiziert werden können. Diese Positionen sind in Abb. 2.5. zu sehen.

Welche Rolle die Modifikationen für Struktur und Funktion der tRNA haben, ist bisher noch wenig geklärt. Eine große Anzahl von Modifikationen besteht aus der Substitution eines Wasserstoffes durch eine Methylgruppe. Dabei kommen einzelne oder mehrfache Methylierungen an Purinen, Pyrimidinen und an der 2'OH Gruppe der Ribose vor. Die durchschnittliche Anzahl von Methylgruppen in einem tRNA-Molekül steigt von niederen zu höheren Organismen. In Prokaryonten finden sich im Durchschnitt zwei methylierte Nukleoside pro tRNA, in Hefe 4-6, in Säugerzellen 8-10. Außerdem nimmt nicht nur die absolute Anzahl, sondern auch die Variabilität zu.

Die Methylierung ist ein Ereignis, von dem man annimmt, daß es bei Eukaryonten nach der Transcription im Kern abläuft. Die Methylierungen werden von Enzymen katalysiert, die Methylgruppen des S-Adenosylmethionins auf die Nukleoside übertragen. Dies geschieht vorwiegend auf der Vorläuferstufe der tRNA. Damit ist S-Adenosylmethionin Vorläufer der Methylgruppen der tRNA und der Polyamine Spermidin und Spermin.

Im Arbeitskreis Kersten werden seit einigen Jahren die Struktur, Biosynthese und funktionelle Bedeutung von modifizierten Nukleosiden der tRNA untersucht (Raettig et al. 1977, Kersten et al. 1978, Albani et al. 1976, Murao et al. 1978, Hoburg et al. 1979).

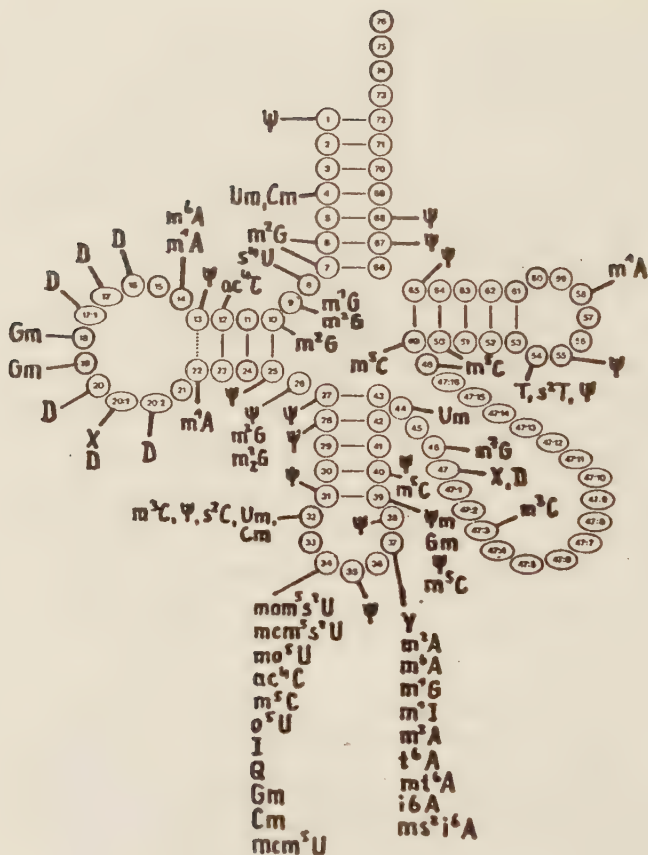


Abb. 2.5.

Positionen der häufig vorkommenden Modifikationen der tRNA. Die Ziffern bezeichnen die allgemein gültige Numerierung der Nukleoside.

Eine spezifische Funktion von modifizierten Nukleosiden wurde bisher nur in wenigen Fällen nachgewiesen z.B. für Ribothymidin in Position 54 der tRNA (siehe Abb. 2.5.). Ribothymidin kommt nahezu in allen Prokaryonten tRNAs und in vielen eukaryontischen tRNAs vor. Untersuchungen im Arbeitskreis Kersten haben gezeigt:

Ribothymidin in dieser Position der tRNA stabilisiert die Tertiärstruktur, beeinflusst die Bindung an Ribosomen (Albani 1979), vermindert die Fehlerrate in einem zell-freien System der Proteinbiosynthese (Kersten et al. 1981).

Von Björk (1970) wurde eine Mutante isoliert, der das methylierende Enzym fehlt und die in der tRNA an Position 54 ein Uridin enthält. Diese Mutante wächst mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Wildtyp, wird jedoch in einer Mischpopulation vom Wildtyp überwachsen. Die Methylgruppe des Ribothymidins scheint demnach für den Organismus von Vorteil zu sein. Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache bieten Befunde aus unserem Labor:

In niederen Eukaryonten, in denen tRNA Moleküle vorkommen, die an Position 54 unvollständig methyliert sind und sowohl T als auch U enthalten, werden die T-haltigen bevorzugt zu Proteinsynthese verwendet (Dingermann, Pistel, Kersten 1980).

Neben den Methylierungen kommen noch eine Reihe von Hypermodifikationen mit zum Teil komplizierten Strukturen vor. Diese Nukleoside finden sich meist im Anticodon oder in der ersten Position neben dem 3'-Ende des Anticodons. Für einige konnte ein Einfluß auf die Basenpaarung mit dem Codon der messenger-RNA nachgewiesen werden (McCloskey 1978, Ostermann 1979). Zusammenfassende Arbeiten über Struktur und Funktion der modifizierten Basen sind von Agris und Söll (1977), Nishimura (1978) und Singer und Kröger (1979) erschienen.

1970 wurde zum ersten Mal von Leboy der stimulierende Einfluß von Polyaminen auf die Methylierung von tRNA in vitro beschrieben (Leboy 1970). Danach konnte mit Zell-extrakten eine Steigerung der Methylgruppenübertragung von S-Adenosylmethionin auf prokaryontische tRNA durch den Zusatz von Putrescin, Spermidin oder Spermin erreicht werden, zum Teil entstanden dabei neue Methylierungsmuster in der tRNA (Wildenauer et al. 1974).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu erstellen, die es ermöglicht, das Vorkommen der freien und acetylierten Polyamine und ihre Konzentration in Pro- und Eukaryonten im picomol-Bereich quantitativ zu bestimmen. Diese Analyse sollte es ermöglichen zu klären, ob auch in vivo ein Zusammenhang besteht zwischen den Polyaminspiegeln und dem Ausmaß bzw. dem Methylierungsmuster der tRNA.

Als geeignetes Untersuchungsobjekt wurde insbesondere der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* herangezogen, weil er als einfaches Modellsystem im Laboratorium verwendet werden kann zum Studium von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen. Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* AX-2 wächst in einem komplexen Medium als einzellige Amöbe. Nach Nahrungsentzug werden Zellaggregate gebildet, die einen Entwicklungszyklus durchlaufen, der mit der Ausbildung von Stielzellen und Sporen endet.

In *Dictyostelium discoideum* wurden:

1. Vorkommen und Spiegel der Polyamine,
 2. Modifikationsmuster der tRNA,
 3. Aktivitäten von tRNA-Methyltransferasen
- zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung und unter dem Einfluß von Hemmstoffen der Polyaminsynthese bestimmt.

Polyamine werden bei Patienten mit Tumoren und anderen Krankheiten in erhöhter Menge im Serum und Urin gefunden (Russel 1978). Es sollte geprüft werden, ob die Polyaminanalyse auch für klinische Fragestellungen anzuwenden sei. Hierzu wurden Polyaminspiegel bei Kindern mit verschiedenen Leukämien im Verlaufe der Antitumorthherapie in Zusammenarbeit mit der Kinderklinik Erlangen bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Chemikalien für Polyaminbestimmung:

Putrescin (1,4 Diaminobutan)	Sigma, München
Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,4-butandiamin)	
Spermin (N,N'-bis(3-Aminopropyl)-1,4-butandiamin)	
Cadaverin (1,5 Diaminopentan)	Sigma, München
Norspermidin (3,3' Iminobispropylamin)	
1,3 Diaminopropan	
1,6 Hexandiamin	
1,3 Diamino-2-propanol	Fluka, Buchs Schweiz
o-Phtalaldehyd	Merck, Darmstadt
Brij 35	Serva, Heidelberg

Harze für Polyaminbestimmung:

Durrum DC-6-A	Durrum Corp.
Durrum DC-8-9	Palo Alto USA
Durrum DC-3	

Andere in dieser Arbeit verwendete Materialien und Methoden wurden zum Teil bei T. Dingermann (Dissertation 1980) beschrieben. Es werden nur Änderungen und Ergänzungen aufgeführt.

3.2. Polyaminanalyse

Die chromatographische Trennung der Polyamine wurde mit einem Biotronik LC 6000 E Aminosäurenanalysator, der für Fluoreszenzmessungen ausgerüstet war, durchgeführt. Die 0.5 x 10 cm Säule wurde bis zu einer Höhe von 7.5 cm mit Durrum DC-6-A Harz gefüllt. Die Polyamine wurden mit einem NaCl/Na-citrat Puffersystem (siehe Tab. 4.2.) eluiert.

Die Herstellung von möglichst sauberen Puffern ist von entscheidender Bedeutung für die Haltbarkeit der Säulenfüllung und für die exakt reproduzierbare Trennung der Polyamine. Die besten Ergebnisse wurden erzielt mit Wasser aus einer Milli Q Anlage der Fa. Millipore (Spez. Widerstand 16 - 18 M Ω).

Nach dem Lösen der Salze wurde zunächst ein pH Wert eingestellt, der ungefähr 0.5 Einheiten über dem endgültigen Wert lag. Diese Lösung wurde unter Wasserstrahlvakuum durch ein 0.22 μ m Filter filtriert. Danach wurden die Puffer auf den endgültigen pH Wert und das Endvolumen gebracht. Der Alkohol wurde zugegeben und vorsichtig mit dem Puffer gemischt.

Die Reagenzlösung wurde modifiziert nach der Methode von Marton und Lee (1975) hergestellt. 400 μ g o-Phtaldialdehyd wurden in 20 ml Äthanol gelöst und zusammen mit 5 ml Brij 35 (30% w/v) und 5 ml β -Mercaptoäthanol zu einer mit Stickstoff gesättigten Lösung von 74.2 g Borsäure und 60.0 g KOH in 2 l Wasser gegeben. Das Reagenz wurde gekühlt unter Stickstoff aufbewahrt und war eine Woche haltbar.

Nach jedem Lauf wurde die Säule mit einer 0.6 N NaOH Lösung für 15 min. regeneriert und anschließend 15 min. mit dem Startpuffer äquilibriert. Nach jeder Analyse wurde durch eine Expansionszeit von 5 min. wieder das Ausgangsbettvolumen der Säule eingestellt.

Die Durchflußrate für die Puffer betrug 45 ml/h und für das Reagenz 28 ml/h.

Während einer Analyse unter diesen Bedingungen überstieg der Druck an der Pufferpumpe 43 kp/cm² nicht; an der Reagenzpumpe traten maximal 13 kp/cm² auf. Eine Überschreitung dieser Werte wurde nur dann beobachtet, wenn die Säulenfritten verschmutzt waren oder das Harz regeneriert werden mußte.

Die Reaktion des o-Phtaldialdehyds mit dem Säuleneluat erfolgte in einem 1.5 m langen Teflonschlauch mit 0.5 mm Durchmesser. Das entstandene Reaktionsprodukt wurde

fluorimetrisch bestimmt. Die Excitation erfolgte bei 340 nm, die Messung bei 455 nm.

Zur mathematischen Auswertung der photometrischen Messung diente ein System I Rechner der Fa. Spectra Physics (Darmstadt). Für die Auswertung der Chromatogramme wurden folgende Parameter erarbeitet:

#201 FILE 1

10	ID	ID = Identification
72	PW	PW = Peak width
3000	SS	SS = Slope sensivity
3	FP	FP = Fused peaks
2	BL	BL = Baseline test
300	T1	T1 = Delay time
10000	MA	MA = Minimum area
10	PL	PL = Plateau test
50000	ML	ML = Maximum baseline level
	SP	SP = Spike trap

- - - -

Für die Bedeutung und Zusammenhänge der einzelnen Parameter siehe: SYSTEM I Computing Integrator, Part Nr. 21941-020 6th Edition, Spectra Physics, Santa Clara, Calif. USA.

Der automatische Analysenablauf wurde mit drei Programmen gesteuert (Abb. 3.1.).

Analysenprogramm PA 1

Art der Analyse: Zelleextr.

Funktionen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Schritt	in min.	Pufferventil Puffer 1	Pufferventil Puffer 2	Pufferventil Puffer 3	Pufferventil Puffer 4	Pufferventil Puffer 5	Pufferventil Puffer 6	Ventil G (NaOH o LiOH)	Pufferpumpe	Minhydrinpumpe	Autom. Probenaufgeber	Temperatur T1	Temperatur T2	Temperatur T3	Schreiber	Kühlwasserventil	Sicherheitsabschaltung	Rechner - Integrator	
1	20		0						0		0	0							
2	5		0						0	0			0			0	0		
3	22			0					0	0			0		0	0	0	0	
4	29				0				0	0			0		0	0	0	0	
5	5							0	0	0			0		0		0	0	
6	10							0	0				0						
7	15		0						0			0							
8	5											0							
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			

Abb.3.1.

Programm PA 1 für die Bestimmung der Polyamine in Zelleextrakten.

Analysenprogramm PA 2

Art der Analyse: Urin

Funktionen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Schritt		Pufferventil Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Puffer 5	Puffer 6	Ventil G (NaOH o LiOH)	Pufferpumpe	Minhydrinpumpe	Autom. Probenaufgeber	Temperatur T ₁	Temperatur T ₂	Temperatur T ₃	Schreiber	Kühlwasserventil	Sicherheitsabschaltung	Rechner-Integrator	
	in min.																		
1	1	0							0		0							0	
2	26		0						0				0		0			0	
3	22			0					0	0			0		0		0	0	
4	29				0				0	0			0		0		0	0	
5	5							0	0	0			0		0		0	0	
6	10							0	0				0						
7	15	0							0			0							
8	5											0							
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			

Abb. 3.1.

Programm PA 2 für die Bestimmung von Acetylspermidin, Spermidin, Putrescin und Spermin im Urin.

Analysenprogramm PA 3

Art der Analyse: Urin

Funktionen		Schritt																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
in min.		Aufferventil Puffer 1	Pufferv. Puffer 2	Pufferv. Puffer 3	Pufferv. Puffer 4	Pufferv. Puffer 5	Pufferv. Puffer 6	Ventil 6 (NaOH o LiOH)	Pufferpumpe	Ninhydrinpumpe	Autom. Probenaufgeber	Temperatur T1	Temperatur T2	Temperatur T3	Schreiber	Kühlwasserventil	Sicherheitsschaltung	Rechner-Integrator	
1	35	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0		0						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0			0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	5				0				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	10							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	15							0	0			0	0	0	0	0	0	0	
7	5	0							0			0	0	0	0	0	0	0	
8												0							
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			

Abb. 3.1.

Programm PA 3 für die Bestimmung von Acetylputrescin im Urin.

3.3. Wachstums- und Differenzierungsbedingungen für Dictyostelium disc.

Vegetatives Wachstum, Entwicklung in Submerskulturen und Entwicklung auf Agar-Platten (siehe hierzu auch Dingermann S. 30 - 32).

3.3.1. Entwicklung auf Filtern

Puffer:	KH_2PO_4	1.9 g
	$\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.35 g
	Aqua bidest	ad 1000 ml

Vegetativ wachsende Zellen wurden in einer Christ-Variofuge oder einer Beckmann L6 Zentrifuge bei 3000 x g 3 min. abzentrifugiert, zweimal mit Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Die Petrischalen, in denen die Entwicklung durchgeführt werden sollte, wurden folgendermaßen vorbehandelt: Zwei sterile Filter (Schleicher und Schüll 1575, Durchmesser 9.6 cm) wurden mit sterilem Phosphatpuffer getränkt und mit einem trockenen Filter bedeckt. Auf diesem Filter wurden 2×10^8 Zellen ausgestrichen. Die Petrischalen wurden mit Aluminiumfolie locker bedeckt und bei Raumtemperatur belassen. Unter diesen Bedingungen erreichten die Zellen nach etwa 10 - 12 Stunden das "mexican hat" Stadium, nach etwa 26 - 28 Stunden war der Entwicklungszyklus beendet.

Entscheidend für die Entwicklung ist die Oberfläche der Filter und ihre Feuchtigkeit. Die Filter wurden durch UV-Licht sterilisiert, da durch Autoklavieren die Oberfläche so stark aufgerauht wurde, daß die Zellen nicht mehr zusammenfließen konnten. Die angegebenen Flüssigkeitsmengen für die Filter und die Zellsuspension waren ausreichend für einen normal belüfteten Raum mit einer Temperatur von 20 - 22°C. Veränderte Bedingungen müssen durch Variation der Flüssigkeitsmengen ausgeglichen werden.

3.3.2. Markierung der tRNA

Wenn Zellen während der Entwicklung mit radioaktiven Substanzen markiert oder mit Hemmstoffen behandelt werden sollten, wurde zum entsprechenden Zeitpunkt das obere Filter abgehoben und in eine sterile Petrischale überführt, welche die markierte Substanz in 250 μ l Phosphatpuffer enthielt.

3.3.3. Züchtung in phosphatarmem Medium

siehe Dingermann S. 32

3.4. Präparation von Gesamt-tRNA

3.4.1. Präparation von tRNA aus vegetativen Zellen

Pufferlösungen:

I. TMS Puffer

0.01	M	MgCl ₂	
0.002	M	Na ₂ S ₂ O ₃	
0.01	M	Tris/HCl	pH 7.5

II.	0.25	M	NaCl	
	0.01	M	Mg-Azetat	
	0.001	M	EDTA	pH 4.8

III.	0.5	M	NaCl	
	0.01	M	Mg-Azetat	
	0.001	M	EDTA	pH 4.8

Sämtliche Arbeitsgänge wurden bei 4°C ausgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden mit der 2.5fachen Menge Alcoa einige Minuten im Mörser zerrieben und in einer Menge Puffer suspendiert, die dem Ausgangsfeuchtgewicht der Zellen entsprach. Diese Suspension wurde zur Entfernung des Alcoa 10 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, das Volumen bestimmt, und mit der gleichen Menge Phenol 80% (80 g Phenol, TMS-Puffer ad 100 ml) 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden durch Zentrifugation (12 000 x g, 20 min.) die Phasen getrennt und die wässrige Phase abgenommen. Die Phenolphase wurde nochmals mit der gleichen Menge TMS-Puffer extrahiert. Das Volumen der vereinigten wässrigen Phasen wurde bestimmt und die 2.5fache Menge Äthanol zugefügt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde die Lösung über Nacht bei -20°C aufbewahrt.

Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation (30 000 x g, 20 min.) gesammelt, im Exsiccator getrocknet und mit Puffer I aufgenommen. Die Lösung wurde auf eine DEAE-Säule aufgetragen, die zuvor mit Puffer II äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer gespült, bis im Eluat kein absorbierendes Material mehr nachzuweisen war. Die Nukleinsäuren wurden mit Puffer III eluiert und mit 2.5 Volumen Äthanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Dieses Verfahren ist kürzer als die von Dingermann beschriebene Methode und hat den Vorteil, daß die tRNA in einem Puffer mit geringerer Salzkonzentration erhalten wird (Dingermann 0.75 M NaCl). Die Ausbeute an tRNA ist mit beiden Methoden gleich.

3.4.2. Isolierung von tRNA aus Zellen des "mexican hat" Stadiums

Puffer:	0.01	M	MgCl_2	
	0.002	M	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	
	0.01	M	Tris/HCl	pH 7.5

Sämtliche Arbeitgänge wurden bei 4°C ausgeführt. Auf jeweils ein Filter mit dem differenzierenden Schleimpilz wurden 3 ml Puffer pipetiert, der 4%ig an

Triton X 100 (v/v) war. Die Petrischalen mit dem Filter wurden in einer New Brunswick Schüttelmaschine 1 min. bei 0 - 4°C geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde mit einer Eppendorf Pippette abgezogen und jedes Filter in kleine Teile zerschnitten. Je ein zerschnittenes Filter wurde in ein Eppendorf cap gestopft, dessen Spitze perforiert war. Das cap wurde auf ein Zentrifugenglas gesetzt und 1 min. in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und 30 min. bei 4°C mit der gleichen Menge Phenol 80% (80 g Phenol, Puffer ad 100 ml) gerührt. Nach der Trennung der Phasen wurde die Phenolphase noch einmal mit 3 ml Puffer abgezogen und die wässrigen Phasen vereinigt. Die Ausbeute pro Filter betrug 1.5 - 2.5 A₂₆₀ tRNA. Zur weiteren Reinigung wurden die so isolierten tRNAs von DNA und den größeren RNAs durch Gelchromatographie an Sephadex G 100 getrennt.

3.4.3. Gelchromatographie von tRNA an Sephadex G 100

Puffer: 0.1 M NaCl
 0.01 M MgCl₂
 0.01 M Tris/HCl pH 7.5

Präparation des Gels und der Säule:

Sephadex G 100 Pulver wurde in einem Überschuß Puffer 24 Stunden gequollen und anschließend sterilisiert. Eine Säule mit 1.5 cm Durchmesser wurde bis zu einer Höhe von 120 cm gefüllt und mit Puffer äquilibriert. Die tRNA wurde in einem Volumen von nicht mehr als 500 ul auf die Säule aufgetragen und hydrostatisch eluiert (Durchfluß: 10 ml/h). Das Elutionsprofil einer G 100 Chromatographie ist in Abb. 3.2. zu sehen. Bei Auftragsmengen von 0.5 - 5.0 A₂₆₀ tRNA wird bei diesem Verfahren die tRNA vollständig von anderen Nukleinsäuren getrennt.

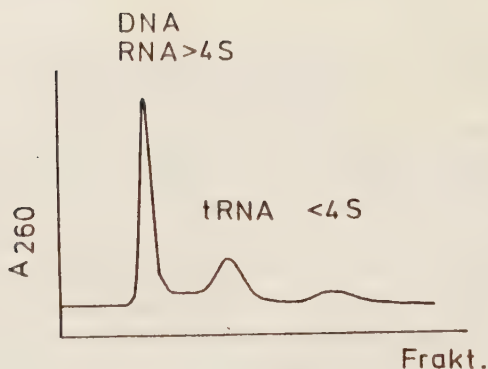


Abb. 3.2. Elutionsprofil einer Sephadex G 100 Chromatographie

3.5. Entsalzen von tRNA-haltigen Lösungen

Entsalzen durch Chromatographie an Sephadex G 25:

Sephadex G 25 Pulver wurde mit einem Überschuß an Wasser über Nacht gequollen und anschließend sterilisiert. Mit dieser Suspension wurde eine Säule von 2 x 100 cm gefüllt und mit bidestilliertem Wasser äquilibriert. Die salzhaltigen tRNA-Lösungen wurden in einem Volumen von nicht mehr als 2 ml auf die Säule aufgetragen und hydrostatisch eluiert (Durchfluß: 2 - 3 ml/min.). Die nukleinsäurehaltigen Fraktionen wurden im Rotavapor auf 1 - 2 ml eingengt und mit 2.5 Volumen Äthanol gefällt.

Entsalzen durch Dialyse:

Größere Mengen an salzhaltigen tRNA-Lösungen wurden 3x gegen 200 Volumen Aqua bidest dialysiert. Zur Dialyse wurden Schläuche verwendet, die zuvor zweimal mit 5%iger Na_2CO_3 -Lösung und zweimal mit Aqua bidest ausgekocht wurden. Das Dialysat wurde im Rotavapor eingengt und die Nukleinsäuren mit 2.5 Volumen Äthanol gefällt.

3.6. tRNA-freie Enzymextrakte aus Dictyostelium disc.

Puffer:	I	0.01	M	Tris/HCl	pH 7.5
		0.01	M	MgCl ₂	
		10 ⁻⁴	M	β-ME	
		10%		Glycerin	
	II	Puffer I + 0.2 M KCl			
	III	0.02	M	Tris/HCl	pH 7.5
		10 ⁻⁴	M	β-ME	
		10%		Glycerin	

Sämtliche Arbeitsgänge wurden bei 4°C ausgeführt.

10 g Zellen wurden nach dem Zentrifugieren mit Phosphatpuffer gewaschen und mit 25 g Alcoa im Mörtel gut verrieben. 10 ml Puffer I wurden in Portionen von 2 ml zugegeben und solange verrührt, bis eine homogene Masse entstand. Das Homogenat wurde mit weiteren 5 ml Puffer I in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Alcoa bei 5000 x g 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 45 min. bei 30 000 x g zentrifugiert. Für die Präparation eines S₇₈ wurde eine Zentrifugation von einer Stunde bei 78 000 x g angeschlossen.

Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und mit einer 1 M KCl Lösung auf 0.2 M KCl eingestellt und auf eine DE 32 Säule (3 x 10 cm) aufgetragen. Die Säule war zuvor mit Puffer II äquilibriert worden. Die Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen erfolgt durch Elution mit dem gleichen Puffer. Die Nukleinsäuren werden als Anionen auf dem Harz festgehalten, die Proteine erscheinen im Eluat.

Fraktionen, deren Quotient A_{260}/A_{280} kleiner als 1.2 (mehr als 95% Protein) war, wurden vereinigt und zu 85% mit Ammoniumsulfat gesättigt. Die dafür notwendige Menge (NH₄)₂SO₄ wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht durch Rühren in Lösung gebracht.

Der Niederschlag wurde 20 min. bei 30 000 x g abzentrifugiert und in möglichst wenig Puffer III suspendiert. Die Suspension wurde 3x gegen 200 Volumen Puffer III dialysiert, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Protein wurde nach der Mikro-Biuret Methode bestimmt. Werte zwischen 10 - 15 mg/ml Protein waren für die Methylierung am günstigsten und zeigten die längste Haltbarkeit.

3.7. Methylierung von tRNA

Puffer: 3.3 mM Triäthylamin/HCl pH 8.0
 0.55 mM β -ME
 0.33 mM MgCl_2

Methylierungen von tRNA mit Extrakten aus Dictyostelium wurden modifiziert nach Schmidt (1977) durchgeführt. Als Standardansatz wurden 0.1 A₂₆₀ tRNA in einem 160 μl Ansatz methyliert. Der Ansatz enthielt ferner 50 μl Puffer, 200 mg Enzymextrakt, 0.2 μCi ^{14}C -S-Adenosyl-Methionin (10 - 15 mCi/mmol) und verschiedene Mengen Polyamine. Die Spezifische Aktivität des SAMs wurde so eingestellt, daß pro Ansatz 20 nmol SAM eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem ein Aliquot des Ansatzes auf ein Whatman 3MM Filter (25 mm $\varnothing$) pipetiert wurde und dieses in eiskalte TCA (10%) gegeben wurde. Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde durch folgende Waschgänge entfernt:

3 x TCA 5%, 3 x Äthanol abs., 3 x Äther (je 1 min.). Bei jedem Wechsel der Waschflüssigkeit wurden die Proben auf ein Selecta Faltenfilter ausgelegt.

Sollte die tRNA zurückgewonnen werden, wurde der Ansatz nach 4 Stunden durch Zugabe der gleichen Menge Phenol/Chloroform 1:1 gestoppt. Nach der Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase nochmals mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann 2 x mit je 100 μ l Wasser extrahiert und die gesammelten wässrigen Phasen zum Abtrennen des überschüssigen SAMs auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen und wie unter 3.4. beschrieben weiterbehandelt.

3.8. Bausteinanalyse von tRNA

Die dünnschichtchromatographischen Verfahren der Nukleosid- bzw. Nukleotidanalyse von tRNA sind bei Dingermann S. 42 - 45 beschrieben.

Eine neue Methode für die Bestimmung von Nukleosiden wurde 1979 von Davis et al. veröffentlicht. Die Trennung erfolgt unter hohen Drucken an RP-18 Säulen. In dieser Arbeit wurde mit einer HPLC-Anlage der Fa. Altex (Lieferfirma: Kontron, München) gearbeitet, die mit zwei hintereinander geschalteten Säulen der Fa. Waters (u Bondapak C₁₈/Porasil) ausgerüstet war. Jede Säule hatte eine Dimension von 300 x 4 mm. Die Säulentemperatur wurde durch einen thermostatierten Aluminiumblock konstant bei 37°C gehalten. Die Methode hat entscheidende Vorteile gegenüber den dünnschichtchromatographischen Verfahren:

- 1) Die Empfindlichkeit liegt im Nanomol-Bereich
- 2) Die Nukleoside können mit hoher Genauigkeit direkt bestimmt werden
- 3) Radioaktiv markierte Nukleoside können in kleinen Mengen durch Zählung des Säuleneluats schnell und quantitativ erfaßt werden
- 4) Die Analysendauer für ein tRNA-Hydrolysat beträgt etwa 2 Stunden
- 5) Nukleoside können einfach in präparativem Maßstab isoliert werden

Die tRNA wurde nach folgendem Verfahren zu Nukleosiden verdaut:

0.5 A₂₆₀ zur Trockne eingedampfte tRNA wurden in 20 µl NH₄-Az 30 mM pH 5.5 aufgenommen und zwei Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µl ZnSO₄ 10 mM, 5 µl P₁Nuklease (1 mg/ml) und 10 µl alkalischer Phosphatase (6.8 mg/ml) wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl Tris/HCl 0.5 M pH 7.9 wurde nochmals eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmung der Nukleoside wurden Teile des Ansatzes ohne weitere Reinigung analysiert.

Für die Elution wurden zwei Puffersysteme verwendet:

System A:	Puffer I	0.01 M	NH ₄ H ₂ PO ₄	pH 5.3
		2.5%	CH ₃ OH	Laufzeit: 0 - 35 min.

Puffer II	0.01 M	NH ₄ H ₂ PO ₄	pH 5.1
	8%	CH ₃ OH	

System B:	Puffer I	0.1 M	NH ₄ H ₂ PO ₄	pH 5.1
-----------	----------	-------	--	--------

Puffer II	0.1 M	NH ₄ H ₂ PO ₄	pH 5.1
	40%	CH ₃ OH	

Puffer I und II des Systems B wurden nach folgendem Programm gemischt:

0 - 20 min.	100% I
20.1 - 35 min.	9.4% II
35.1 - 50 min.	18.8% II
50.1 - 80 min.	18.8 - 100% II

Für die Bestimmung von Nukleosiden im Bereich zwischen Pseudouridin (U) und Guanosin (G) ist System A geeigneter (Abb. 3.3.). Auf Grund der niedrigeren Ionenstärke wird eine bessere Auflösung des Chromatogramms speziell zwischen Inosin (I), Ribothymidin (T) und Guanosin erreicht. Stark hydrophobe Nukleoside wie isopentenyl-Adenosin (i⁶A), 2-methylthio-isopentenyl-Adenosin (ms²i⁶A)

oder Dimethyladenosin (m_2^2A) können mit diesem Puffersystem nicht mehr eluiert werden. Für die Bestimmung dieser Nukleoside wurde System B verwendet (Abb. 3.3.). Die Methode ist auf Grund ihrer hohen Sensitivität sehr störanfällig. Kritisch ist vor allem die Qualität des verwendeten Wassers. Reproduzierbare Chromatogramme konnten nur mit deionisiertem Wasser, das zusätzlich über eine Milli Q Anlage der Fa. Millipore gereinigt wurde, erhalten werden. Die Puffer wurden mit Merck Chemikalien (P.A. Qualität) angesetzt und vor Gebrauch durch ein 0.22 μ m Filter gereinigt.

3.9. Zweidimensionale Gelelektrophorese von tRNA

Die analytische zweidimensionale Gelelektrophorese wurde modifiziert nach der von Fradin et al. (1970) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Modifikationen wurden zusammen mit T. Dingermann entwickelt und sind in dessen Dissertation auf den Seiten 47 - 50 beschrieben.

3.10. Quantitative Analyse von RNA, Protein und Polyaminen in Zellextrakten

Dictyostelium disc. Zellen wurden bei 3000 x g abzentrifugiert und zweimal mit Phosphatpuffer (siehe 3.2.1.) gewaschen. 100 mg Feuchtgewicht Zellen wurden 2x mit je 1 ml TCA 10% versetzt und 60 min. bei 4°C gerührt. Vom Überstand der anschließenden Zentrifugation wurden - entsprechend der Zellzahl - Teile für die Polyaminanalyse verwendet (siehe S. 67). Der Niederschlag der ersten TCA Fällung wurde erneut mit 200 μ l TCA 10% versetzt und 15 min. bei 90°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde bei 10 000 x g abzentrifugiert und aus dem Überstand die RNA nach der Orcinmethode bestimmt. Das ver-

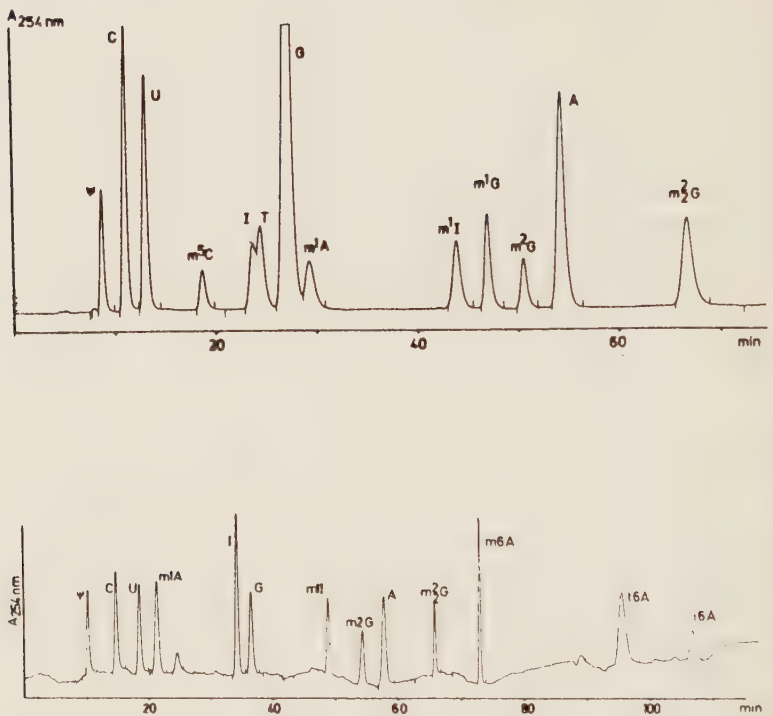


Abb. 3.3.

HPLC-Trennungen von Nukleosid-Standardgemischen.

Säulen: zwei 300 x 4 mm uBondapak C₁₈ Porasil hintereinandergeschaltet, Durchfluß: 1 ml/min., Temp.: 37°C, Detektor: 0.01 $A_{254\text{nm}}$ Vollausschlag. a) System A, Die Mengen der Nukleoside wurden den Mengenverhältnissen in einem tRNA-Hydrolysat angeglichen. b) System B, 1 nmol/Nukleosid

bleibende Protein wurde mit 100 μ l 1 N NaOH 15 min. bei 60°C inkubiert und das Protein nach der Mikro-Biuret Methode bestimmt. Für jeden Aufschluß wurden die Flüssigkeitsmengen zur Bestimmung von Protein und RNA nach den Literaturwerten (Loomis 1975) gesondert berechnet. Die Bereitung der Standardlösungen und die Bestimmungen wurden nach der Vorschrift ausgeführt, die bei Rummel (1977) beschrieben ist.

4. Resultate

4.1. Analyse der freien Polyamine

In Geweben von Säugern liegt die Konzentration des Putrescins, des Vorläufers des Spermidins und des Spermins im nanomolaren Bereich, steigt jedoch drastisch unter dem Einfluß von Stimulantien der Ornithindecaboxylase (ODC). Die Konzentrationen von Spermidin und Spermin, die bei etwa 0.2 - 10 mM liegen, werden jedoch in keinem Fall erreicht. In extrazellulären Flüssigkeiten ist die Konzentration der Polyamine wesentlich geringer (Abb. 4.1.). Diese niedrige Konzentration, sowie die häufig begrenzte Menge an Untersuchungsmaterial, erfordern eine sehr empfindliche Meßmethode. Die Polyamine müssen außerdem von Stoffen mit primärer oder sekundärer Aminogruppe, die in einem hohen Überschuß gegenüber den Polyaminen vorkommen, abgetrennt werden. Die Ausscheidung im Urin eines gesunden Erwachsenen beträgt etwa 800 mg/24h Aminosäuren und 680 mg/24h Ammoniak (Geigy Tabellen 1978). Auf Grund dieser unterschiedlichen Mengenverhältnisse ist von einer geeigneten Bestimmungsmethode zusätzlich ein hohes Maß an Spezifität zu verlangen.

Da die Polyamine keine strukturellen Eigenschaften besitzen, die ihre Bestimmung ohne Überführung in geeignete Derivate erlaubt, basieren alle chemischen Bestimmungsmethoden auf mindestens zwei Schritten: Derivatisierung und Trennung. Die Reihenfolge der Schritte kann dabei verschieden sein.

Es wurden viele Methoden beschrieben, die die Trennung der freien Polyamine voneinander ermöglichen (Seiler 1977, Abdel-Monem 1978). Mit Ausnahme der Ionenaustauschchromatographie erfordern alle Trennsysteme eine Vorreinigung der Probe. Eine Vorreinigung ist jedoch zeitaufwendig und birgt die Gefahr des Verlustes von Substanzen, welche nur in sehr geringen Mengen in der Probe vorhanden sind.

Fluid	Putrescine	Spermidine	Spermine	Units
Amino acid analyzer				
Urine	1.6-2.1	0.9-2.1	< 0.4	mg/24 hr
Urine	1.9-3.1	2.0-2.8	0.2-0.6	mg/24 hr
Urine	1.1-2.4	1.1-2.2	0.2-0.6	mg/24 hr
Urine	1.1-3.1	1.2-2.0	0.1-0.7	mg/24 hr
Urine	1-6	3-12	3-15	nmole/mg creatinine
Urine	0.4-2.1	0.4-2.1	0.02-0.3	µg/mg creatinine
Serum	0.07-0.43	0.22-0.44	< 0.11	nmole/ml
CSF	92-259	97-243		pmole/ml
Thin-layer chroma- tography				
Urine	1.0-5.0	1.0-2.0	< 0.5	mg/24 hr
Urine	1.0-18.0	0.4-4.0	0.6-2.4	mg/24 hr
Urine	1.9-3.1	2.0-2.8	0.2-0.6	mg/24 hr
Electrophoresis				
Urine	2.2-3.2	2.6-3.6	2.8-4.0	mg/24 hr
Urine	1.9-6.0	1.3-4.6	1.3-4.5	mg/24 hr
Urine	1.0-6.0	1.0-4.0	1.0-4.0	mg/24 hr
Gas chromatography				
Urine	1.2-1.3	0.9-1.2	0.2-0.3	mg/24 hr
Urine	0.9-2.4	0.8-2.7	0.2-0.7	mg/24 hr
Radioimmunoassay				
Serum			10-60	ng/ml

Abb. 4.1. Polyaminkonzentration in extrazellulären Flüssigkeiten (Russel 1978).
Die Polyamine wurden nach vorheriger Hydrolyse bestimmt, wobei die z.T. acetylierten Derivate gespalten und zusammen mit den freien Polyaminen bestimmt wurden.

Daher bietet sich die Bestimmung der Polyamine durch Ionenaustauschchromatographie mit automatisierten Geräten für eine rasche und routinemäßige Bestimmung der Polyamine an.

Basismethode

Marton und Lee (1975) haben eine Methode beschrieben, die die Bestimmung der hauptsächlich vorkommenden Polyamine Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin erlaubt. Die Trennung erfolgt mit einem modifizierten Aminosäureanalysator. Durch Verwendung von o-Phtaldialdehyd als Reagenz wurde eine Nachweisgrenze von 3 - 6 pmol Putrescin und Spermidin und 12 - 15 pmol Spermin erreicht. o-Phtaldialdehyd bildet mit primären Aminen ein intensiv blau fluoreszierendes Kondensationsprodukt unbekannter Struktur. Das Aktivierungsmaximum der Verbindung liegt bei 340 nm, Das Emissionsmaximum bei 455 nm.

Basierend auf der Methode von Marton und Lee wurde uns von der Firma Biotronik München ein Trennprogramm zur Verfügung gestellt (Methode A). Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tab. 4.1. zusammengestellt

Herstellung der Puffer

Auf Grund der hohen Sensitivität der Methode ist die Reinheit der Pufferchemikalien und des verwendeten Wassers von entscheidender Bedeutung für eine einwandfreie Trennung der Polyamine und die Haltbarkeit des Säulenmaterials. Beste Ergebnisse wurden erzielt mit deionisiertem Wasser, das zusätzlich über eine Milli Q Anlage der Fa. Millipore gereinigt wurde. Bei den verwendeten Chemikalien wurden von Charge zu Charge oft erhebliche Qualitätsunterschiede beobachtet. Die Unterschiede machen sich in verschiedenen großen Gipfeln bemerkbar, die in der Basislinie nach dem Wechsel der Puffer auftreten (siehe Abb. 4.8.).

Tab. 4.1. Natriumcitratpuffer für die Bestimmung der freien Polyamine.

Nummer des Puffers	1	2	3
Natriumchlorid ⁺	0.6	1.5	3.0
Natriumcitrat Dihydrat ⁺	0.3	0.3	0.3
pH Wert	5.80	5.55	5.55
Temperatur °C	68	68	68
Programmierte Laufzeit (min)	10	30	26
Molarität in Na ⁺			

Zufriedenstellende Ergebnisse wurden mit Merck P.A. und Baker "Analyzed Reagent" (Groß-Gerau) Substanzen erzielt.

Nach der Einwaage der Chemikalien wurde die Lösung zunächst auf einen pH Wert eingestellt, der ca. 0.5 Einheiten über dem endgültigen Wert lag. Diese Lösung wurde unter Wasserstrahlvakuum durch ein 0.22 μ m Filter gesaugt, wobei die Puffer entgast wurden. Es ist notwendig, die Puffer möglichst vollständig zu entgasen, um Blasenbildung in den Pumpen und dadurch Schwankungen in der Fördermenge zu vermeiden.

Bei der Filtration wurde bei allen verwendeten Puffer-substanzen ein erheblicher Rückstand auf dem Filter festgestellt, der durch Verunreinigungen im NaCl verursacht wurde.

Die Verwendung filtrierter Puffer verlängerte die Haltbarkeit der Säulenfüllung um das zwei- bis dreifache. Nach der Filtration wurde der endgültige pH Wert eingestellt und die Lösung auf das Endvolumen gebracht. Die so bereiteten Puffer sind mindestens 7 Tage haltbar, die Retentionszeiten der einzelnen Polyamine ändern sich in diesem Zeitraum nicht.

Herstellung der Reagenzlösung

Für das Reagenz wurde eine Lösung von 74.2 g Borsäure und 60 g KOH in 2 l Wasser hergestellt und mindestens 15 min. mit nachgereinigtem Stickstoff gespült. Danach wurden nacheinander, ohne N_2 Zufuhr, 5 ml Mercapto-äthanol, 5 ml einer 30%igen Brij 35 Lösung (w/v) und eine Lösung von 400 mg o-Phtaldialdehyd in 20 ml Äthanol abs. zugegeben. Der o-Phtalaldehyd sollte möglichst schnell abgewogen und gelöst werden, um Verluste durch Oxidation zu vermeiden. Das Reagenz wurde sofort in den Vorratsbehälter des Aminosäureanalysators umgefüllt und wieder mit Stickstoff gespült.

Die so bereitete Lösung war 7 Tage haltbar. Innerhalb dieser Zeit lagen die Variationskoeffizienten - bei einer Standardanalyse pro Tag - für Putrescin bei 2.2%, für Spermidin bei 1.7% und für Spermin bei 1.6%.

Analysenbedingungen

Die Bedingungen für die Analyse sind wie folgt:

Pufferdurchfluß	50.6	ml/h
Reagenzdurchfluß	20.3	ml/h
Säulendimension	0.4 x 10	cm
Harzfüllhöhe	5.8	cm

Die Polyamine wurden an einem Kationenaustauscherharz der Fa. Durrum (Durrum DC-6A) getrennt. Es besteht aus einem sulfonierten Polystyrolgerüst, das über Divinylbenzolbrücken verknüpft ist. Die Partikelgröße beträgt 11 µm.

Die Integration der Peakflächen wurde mit einem System I Rechner der Fa. Spectra Physics durchgeführt (siehe 3.9.). Die Trennung eines Standardgemisches, bestehend aus je 500 pmol Putrescin, Spermidin und Spermin ist in Abb. 4.2. gezeigt.

4.1.1. Erarbeitung von Bedingungen zur Analyse freier und acetylierter Polyamine

In den letzten Jahren wurden immer mehr Systeme beschrieben, in denen Polyamine nicht nur in freier Form vorkommen. Das Monoacetylderivat von Putrescin wurde z.B. im menschlichen Gehirn festgestellt (Perry et al. 1967) und in einigen anderen Organen von Wirbeltieren (Seiler et al. 1973). N¹- und N⁸- Monoacetylspermidin sind Ausscheidungsprodukte im Harn von normalen Individuen und Tumorpatienten (Abdel-Monem et al. 1975).

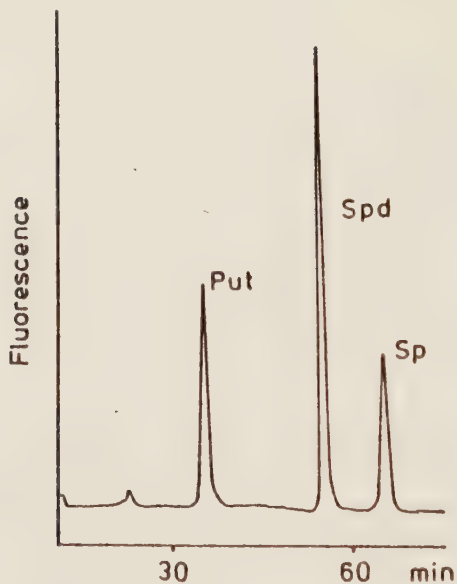


Abb. 4.2. Elutionsprofil eines Standardgemisches von je 500 pMol Putrescin (Put), Spermidin (Spd), und Spermin (Sp). Methode A.

Menschliche kultivierte Lymphozyten enthalten Mono-acetylputrescin und N^1 -Acetylspermidin (Menashe et al. 1980). Die Strukturen der acetylierten Polyamine sind in Abb. 4.3. dargestellt.

Eine routinemäßig brauchbare Methode für die Bestimmung der freien Polyamine zusammen mit den acetylierten Derivaten ist bisher nicht beschrieben worden.

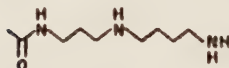
In Dictyostelium disc. findet sich neben Putrescin und Spermidin noch das selten vorkommende Diamin 1,3 Diaminopropan (North und Turner 1978). Dieses Amin wurde in den gängigen Trennsystemen bisher nicht berücksichtigt. Abb. 4.4. zeigt das Chromatogramm eines Standardgemisches, von je 500 pmol Spermidin, Putrescin und Spermin, dem acetylierte Polyamine und Diaminopropan zugesetzt wurden. (Die acetylierten Polyamine wurden uns freundlicherweise von Dr. N. Seiler, Straßbourg, zur Verfügung gestellt.) Das System A ist zur Trennung dieser Substanzen nicht in der Lage. Acetylspermidin kann zwar von Putrescin mit einer genügend hohen Auflösung getrennt werden, besitzt aber exakt die gleiche Retentionszeit wie Diaminopropan. Acetylputrescin erscheint überhaupt nicht als Gipfel.

Im Gegensatz zur Aminosäurenanalyse, bei der das Elutionsverhalten der einzelnen Aminosäuren durch Veränderungen des pH Wertes, der Temperatur und der Ionenstärke der Puffer beeinflußt werden kann, ist die Änderung im Elutionsverhalten der Polyamine auf Grund der stark basischen pH Werte nur durch Variation der Ionenstärke der Puffer möglich.

Eine Verringerung der NaCl Konzentration des Puffers 2 von 1,5 N auf 0,9 N Na^+ trennt zwar Acetylspermidin, Diaminopropan und Putrescin voneinander, Führt aber zu einer Verbreiterung der Gipfel und vermindert damit die Präzision der integrierten Gipfelflächen. Durch gleichzeitigen Zusatz von 5% Äthanol zu den Puffern konnte dieser Nachteil vermindert werden (Abb. 4.5.).



N'-Monoacetylspermine
(N'-(3-acetamidopropyl)-N⁶-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane)



N'-Monoacetylspermidine
(N'-(3-acetamidopropyl)-1,4-diaminobutane)



N⁶-Monoacetylspermidine
(N'-(4-acetamidobutyl)-1,3-diaminopropane)



Monoacetylputrescine
(N'-acetyl - 1,4 - diaminebutane)

Abb. 4.3. Natürlich vorkommende Di- und Polyamine
(Seiler 1979).

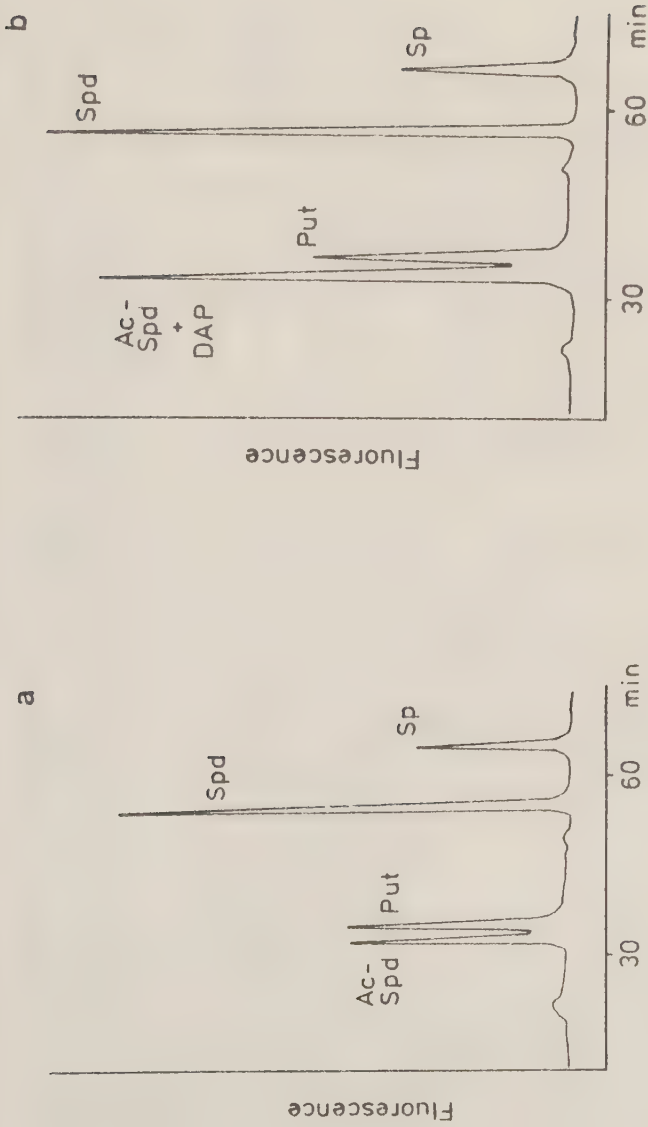


Abb. 4.4.

- a) Chromatogramm eines Standardgemisches von je 500 pmol Acetylputrescin (Ac-Put), N¹-Acetylspermidin (Ac-Spd), Putrescin, Spermidin und Spermin. Methode A.
- b) Wie a) + 500 pmol 1,3 Diaminopropan (DAP).
- In beiden Chromatogrammen erscheint Acetylputrescin nicht als Gipfel.

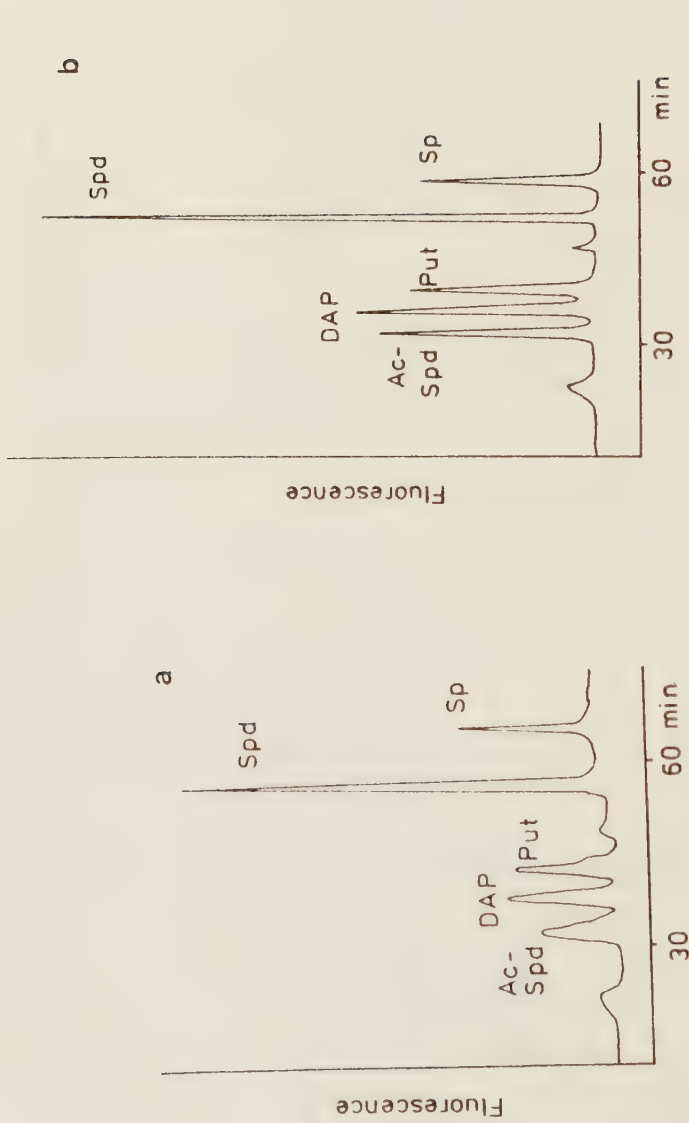


Abb. 4.5. Chromatogramm eines Standardgemisches (500 pmol/Polyamin).

a) Puffer B 0.9 N Na⁺, alle anderen Puffer siehe Tab. 4.1.

b) Puffer B 0.9 N Na⁺, alle anderen Puffer + 5% Äthanol (siehe Tab. 4.2.).

N¹- und N⁸-Monoacetylspermidin werden unter diesen Bedingungen nicht getrennt.

Eine größere Schwierigkeit stellt die Bestimmung von Acetylputresin dar.

Durch die Blockierung der primären Aminogruppe wird der pK Wert der Substanz stark erniedrigt. Durch Analyse von Acetylputrescin mit einem Aminosäuregemisch wurde festgestellt, daß Acetylputrescin in seinem Elutionsverhalten einer neutralen bis schwach basischen Aminosäure entspricht. Daher muß das Trennsystem in der Lage sein, die Aminosäuren zumindest teilweise aufzutrennen. Durch drastische Senkung des pH auf 2.9 und die Verringerung der NaCl Konzentration auf 0.04 N Na⁺ wurde eine Trennung der Aminosäuren in drei Gruppen erreicht (Abb. 4.6.). Acetylputrescin konnte unter diesen Bedingungen noch nicht von Ammoniak getrennt werden. Da beide Substanzen etwa gleich empfindlich auf pH Änderungen reagierten, konnte eine Trennung nur durch Variation von Säulenlänge, Säulentemperatur und Durchflußrate des Puffers erreicht werden. Die Harzfüllhöhe wurde auf 9.0 cm erhöht, die Temperatur auf 73°C angehoben und der Pufferdurchfluß auf 45.5 ml/h verringert (Abb. 4.6.). Entscheidend war, daß unter diesen Bedingungen Acetylputrescin vor Ammoniak eluiert wurde. Auf Grund des großen Überschusses von Ammoniak im Urin gegenüber Acetylputrescin würde eine umgekehrte Elutionsfolge Probleme bei der Auflösung der beiden Gipfel bringen.

Analysenbedingungen für die Bestimmung freier und acetylierter Polyamine.

Aus einem Standardgemisch, bestehend aus je 500 pmol freier und acetylierter Polyamine, 3 nmol eines Aminosäurestandards (Hamilton) und etwa 10 nmol NH₄OH können unter den erarbeiteten Bedingungen alle Polyamine und ihre Derivat getrennt werden (Abb. 4.8.).

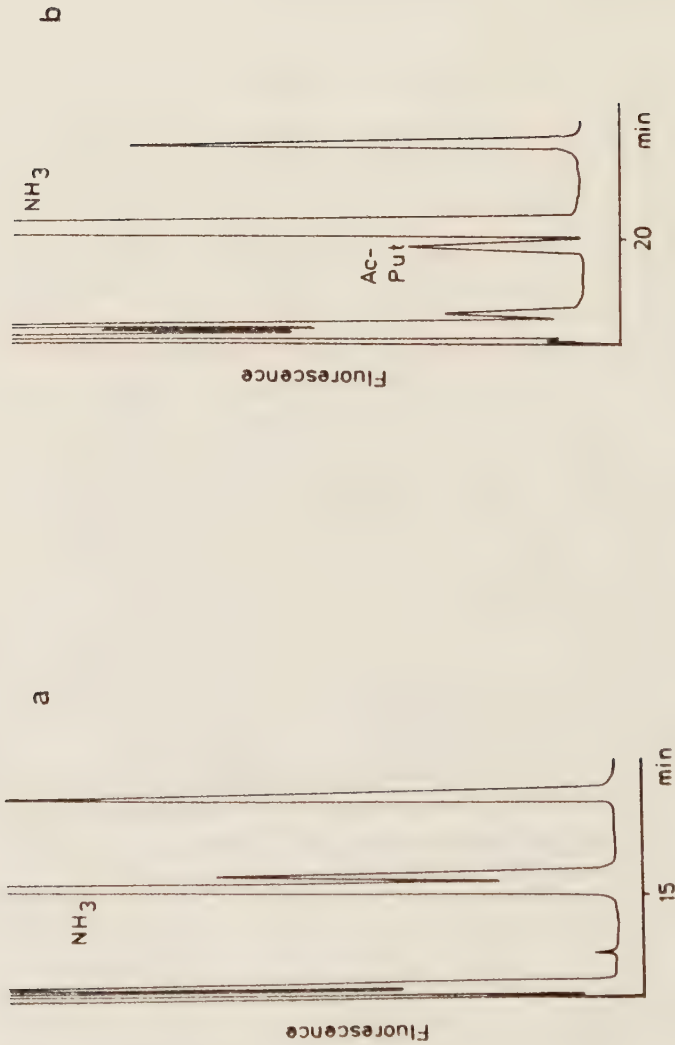


Abb. 4.6. Chromatogramm eines Standardgemisches bestehend aus 3 nmol Aminosäurehydrolysat-standard (Hamilton), 500 pmol Acetylputrescin und ca. 10 nmol NH₄OH.

a) Puffer: 0.04 N Na⁺ pH 2.9
b) Puffer: 0.04 N Na⁺ pH 2.9, Harzfüllhöhe: 9cm, Temp.: 73°C, Pufferdurchfluß: 45.5 ml/h.

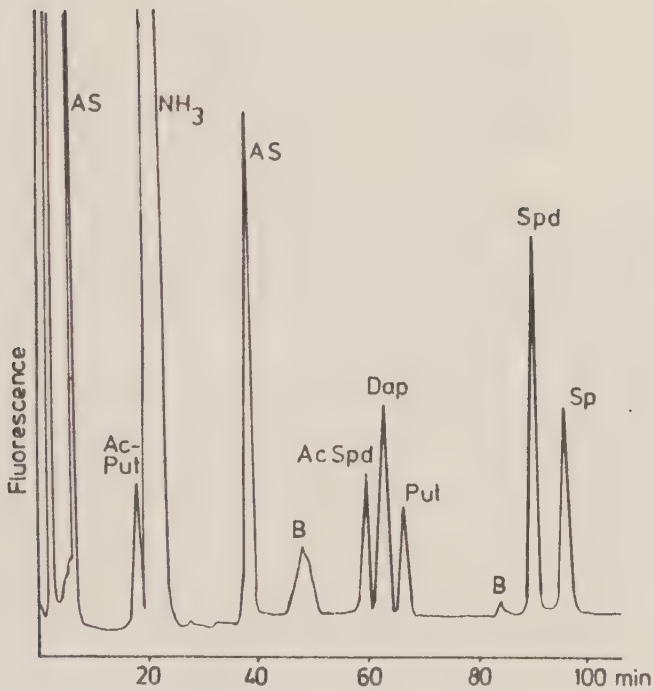


Abb. 4.8.

Chromatogramm eines Standardgemisches, bestehend aus je 500 pmol freien und acetylierten Polyaminen, 3 nmol Hamilton Aminosäurehydrolysatstandard, ca. 10 nmol NH_4OH . AS: Aminosäuren; Ac-Put: Monoacetylputrescin; Ac-Spd: N^1 -Monoacetylspermidin; Dap: 1,3 Diaminopropan; Put: Putrescin. Spd: Spermidin; Sp: Spermin; B: Nach dem Pufferwechsel gelegentlich auftretende Gipfel.

Die Zusammensetzung der Puffer und die Bedingungen der Analyse sind in Tabelle 4.2. zusammengestellt.

Pufferdurchfluß:	45.5 ml/h
Reagenddurchfluß:	28.4 ml/h
Säulendimension:	0.4 x 10 cm
Harzfüllhöhe:	9 cm

Die Säule wurde nach jedem Lauf für 15 min. mit 0.6 N NaOH regeneriert und 15 min. mit dem Startpuffer äquilibriert. Der Druck stieg unter diesen Bedingungen nicht über 43 kp/cm^2 an der Pufferpumpe und an der Reagenzpumpe nicht über 13 kp/cm^2 .

Erhöhter Druck an der Pufferpumpe diente als Indikator für die Verschmutzung der Säulenfritten. Erreichte der Druck auch nach dem Wechsel der Säulenfritten nicht die ursprünglichen Werte, mußte die Säulenfüllung erneuert werden. Durch die Komprimierung des Harzes wurde eine stetige Erhöhung des Drucks auch dann beobachtet, wenn die Analysenläufe unmittelbar nacheinander gestartet wurden. Daher wurde nach jedem Lauf eine Pause von 5 min. programmiert, in der das Harz entspannen konnte.

Die lineare Abhängigkeit des Reaktionsproduktes von o-Phtalaldehyd mit freien Polyaminen wurde von Marton und Lee (1975) gezeigt. Für Acetylputrescin und Acetylspermidin wurde ebenfalls eine lineare Abhängigkeit in dem Bereich von 100 - 2000 pMol gefunden. Die Methode ist somit geeignet bei Konzentrationsunterschieden in diesem Bereich die einzelnen Polyamine in einem Analysenlauf zuverlässig zu bestimmen (Abb. 4.9.).

Die Präzision der Methode ist hoch. Aus 5 Standardanalysen mit 500 pMol/Polyamin wurden Variationskoeffizienten von 1.6 - 3.2% ermittelt (Tab.4.3.).

Die Rückgewinnung wurde an Polyaminextrakten von *D. discoideum* getestet. Hierzu wurden die Polyamine mit 10%iger TCA extrahiert, die 5 uM an Spermin war. Dieses Polyamin kommt in *Dictyostelium* nicht vor. In 100 ul Analysenlösung aus 5 verschiedenen Proben wurden folgende Sperminmengen wiedergefunden (S. 52):

NUMBER OF BUFFER	1	2	3	4
SODIUM CHLORIDE ⁺	-	0.2	0.9	3.0
SODIUM CITRATE DIHYDRATE ⁺	0.04	0.3	0.3	0.3
ETHANOL	5%	5%	5%	5%
FINAL PH	2.90	6.20	5.55	5.55
TEMPERATURE °C	73	68	68	68
TIME (MIN) OF PROGRAMMED BUFFER CHANGE	35	20	22	29

⁺MOLARITY OF Na⁺

Tab. 4.2.
Zusammensetzung und Elutionsbedingungen der Puffer
(Mach, Kersten 1981).

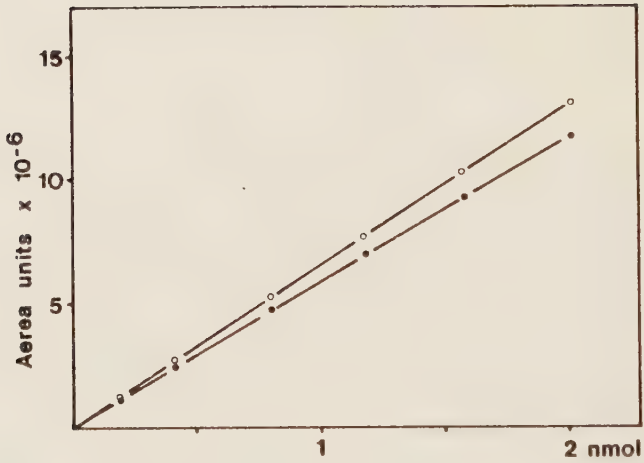


Abb. 4.9.

Die Gipfelflächen im Chromatogramm sind den analysierten Mengen an Acetylputrescin und Acetylspermidin direkt proportional (Mach, Kersten 1981).

o - o Ac-Put, ● - ● Ac-Spd.

PEAK	INTEGRATED AREA ($\bar{X}$)	N	S.D.	VC%	PMOL
Ac-PUT	252 033	5	8 265	3.2%	500.0
Ac-SPD	244 895	5	3 934	1.6%	500.0
PUT	182 209	5	1 910	1.0%	500.0
SPD	480 048	5	10 156	2.1%	500.0
Sp	307 236	5	7 279	2.3%	500.0

Tab. 4.3.
Variationskoeffizienten von Standardanalysen
(Mach, Kersten 1981).

Ansatz	pmol		% Wiedergewinn
	zugegeben	bestimmt	
1	500.0	481.7	96.3
2	500.0	463.4	92.7
3	500.0	498.3	99.6
4	500.0	524.7	104.9
5	500.0	477.7	95.5
		$\bar{x} = 489.2$	$\bar{x} = 97.8$

4.2. Qualitative und quantitative Analyse von Polyaminen in verschiedenen Organismen

Die erarbeitete Methode sollte für die Polyaminanalyse der in unserem Labor verwendeten Organismen und für die Bestimmung der Polyaminausscheidung von Tumorpatienten eingesetzt werden. Daher wurde ihr Anwendungsbereich an verschiedenen Zellsystemen getestet.

4.2.1. Prokaryonten (*Bacillus subtilis*)

Die Polyaminanalyse von *Bacillus subtilis* ist in Abb. 4.10. gezeigt. Aus *B. subtilis*, gezüchtet in einem Minimalmedium

(Nakada 1965), wurden die Polyamine mit Trichloressigsäure extrahiert.

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden einer Kultur 500 μ l entnommen und mit 500 μ l TCA 20% versetzt. Die Polyamine wurden zweimal 1 Stunde bei 4°C extrahiert, wobei die zweite Extraktion mit 500 μ l TCA 10% erfolgte. Von den vereinigten Überständen wurden 150 μ l analysiert. Die intrazelluläre Polyaminkonzentration wurde aus zwei verschiedenen Kulturen bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen:

Zelldichte A_{576nm}	mg Protein/ml Zellsuspension	nmol Spd/mg Protein
2.9	0.89	6.51
3.3	1.01	5.52

Wie das Chromatogramm zeigt, enthält *B. subtilis* fast ausschließlich Spermidin. Die Putrescinkonzentration ist zu gering, um eine quantitative Analyse durchführen zu können (Abb. 4.10.).

Für einen prokaryontischen Organismus ist das Polyaminmuster von *B. subtilis* auffallend. In Prokaryonten werden höhere Putrescin- als Spermidinwerte und meist größere Mengen an Cadaverin gefunden (Bachrach 1973).

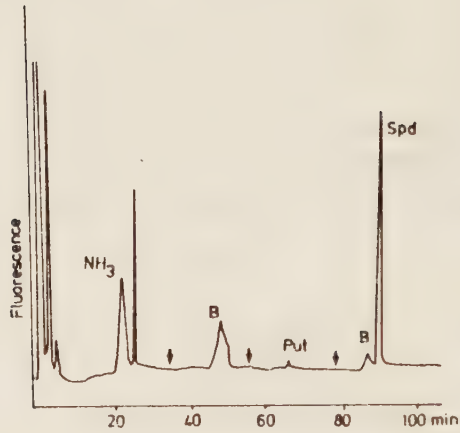


Abb. 4.10 Chromatogramm eines TCA-Extraktes aus *Bacillus subtilis*. $\downarrow$ zeigt die Zeit des programmierten Pufferwechsels. B: siehe Abb. 4.8.

4.2.2. Niedere Eukaryonten (*Dictyostelium discoideum*)

Als Schleimpilz gehört *Dictyostelium discoideum* zu den niederen Eukaryonten. Der Organismus gehört zu der Klasse der Acrasidae und steht damit an der Übergangszone zwischen Pflanze und Tier. Diese Entwicklungsstufe ist auch an seinem Polyaminmuster zu erkennen (Abb. 4.11.).

Bei Zellzahlen zwischen $2 \times 10^6/\text{ml}$ und $4 \times 10^6/\text{ml}$ wurden vegetativ wachsenden Kulturen je 5 ml entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit je 5 ml Phosphatpuffer gewaschen. Die Polyamine wurden mit 10%iger TCA extrahiert. Dazu wurden die Zellen zweimal je 1 Stunde mit der zehnfachen Menge ihres Feuchtgewichtes bei 4°C geschüttelt.

Die Zentrifugation und der anschließende Waschvorgang wurden bei Raumtemperatur ausgeführt, da bei 4°C das Auftreten von Acetylputrescin beobachtet wurde (Abb. 4.11.).

Eine temperaturabhängige Acetylierung von Polyaminen, deren Bedeutung noch unklar ist, wurde auch bei anderen niederen Organismen beschrieben (Tabor und Dobbs 1970). Aus vier verschiedenen Kulturen wurden während der vegetativen Wachstumsphase folgende Polyaminwerte ermittelt:

1,3 Diaminopropan	457.8	$\pm$ 7.3	nmol/ 10^8 Zellen
Putrescin	611.3	$\pm$ 49.6	"
Spermidin	160.2	$\pm$ 9.5	"

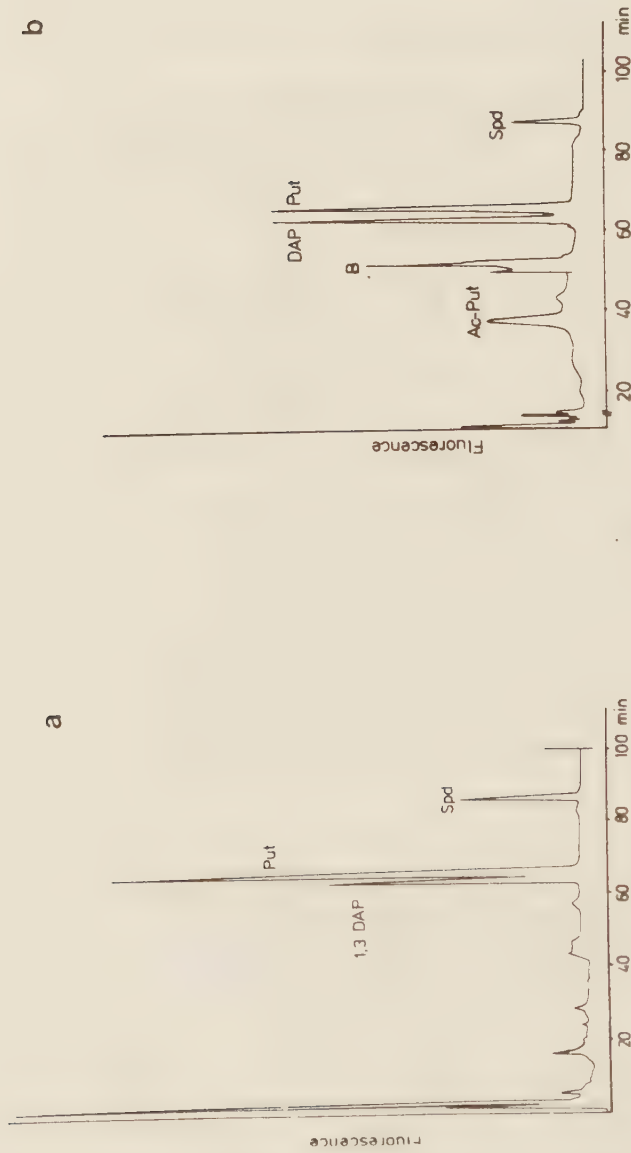


Abb. 4.11.

Chromatogramm eines TCA-Extraktes aus vegetativen Zellen von *Dictyostelium discoideum*

a) Ernte der Zellen bei Raumtemperatur

b) Ernte der Zellen bei 4°C.

4.2.3. Polyaminspiegel im menschlichen Urin

Die erhöhte Ausscheidung von Polyaminen im Urin von Tumorpatienten wurde erstmals 1971 von Russel et al. beschrieben.

1975 wurde von den gleichen Autoren ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Polyaminbestimmung als biochemischer Marker für Tumorwachstum und -therapie eingesetzt werden kann. Ob dieses Modell volle Gültigkeit hat soll im Rahmen einer längerfristigen Studie in Zusammenarbeit mit verschiedenen Erlanger Kliniken geklärt werden.

Es wurden bisher Urinanalysen von Kindern mit verschiedenen Arten von Leukämien über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Eine Zusammenstellung der bisher erhaltenen Daten und ihre Diskussion ist im Anhang dieser Arbeit beschrieben.

Probenvorbereitung für Polyaminanalyse im Urin:

1 ml Urin wurde durch ein Millipore Filter (0.22 μ m) filtriert und verdünnt mit 500 μ l 0.1 N HCl, 250 μ l Äthanol abs. und 250 μ l Puffer 1, der für diesen Zweck auf pH 1.9 eingestellt war (Verdünnung A).

100 μ l Verdünnung A wurde mit 100 μ l Puffer 1 (pH 1.9) nochmals verdünnt (Verdünnung B).

Auf Grund des hohen Überschusses von Aminosäuren und Ammoniak im Urin kann die Konzentration des Acetylputrescins nicht zusammen mit den restlichen Polyaminen ermittelt werden. Für die Bestimmung des Acetylspermidins und der freien Polyamine sind 150 μ l der Verdünnung A ausreichend. Um eine Verkürzung der Analysenzeit zu erreichen, wurde Puffer 2 für 25 min. als Startpuffer benutzt (Abb. 4.12.). Die Konzentration des Acetylputrescins wird in einem getrennten 30 minütigen Chromatogramm nur mit Puffer 1 ermittelt. Hierfür wurden 10 - 20 μ l der Verdünnung B verwendet (Abb. 4.12.). Der Urin für die Analyse durfte nicht älter sein als 24 Stunden. Bei der wiederholten Analyse von Verdünnung B fiel auf, daß die Werte innerhalb kurzer Zeit stark abnahmen. Die Lagerung des Urins erfolgte dabei bei -20°C . Innerhalb von 6 Tagen verringerte sich die Konzentration auf weniger als 50%.

Datum	Put	Ac-Spd	Spd
29.6.79	581.4	512.9	18.1 pmol
5.7.79	212.9	352.5	- pmol

Der Grund für diese Verluste ist unklar. Da bei der Analyse von Urinhydrolysaten keine derartigen Schwankungen beobachtet wurden, findet keine Degradation der Polyamine statt. Denkbar wäre eine Konjugation mit sauren Bestandteilen des Urins, die unter den Analysenbedingungen

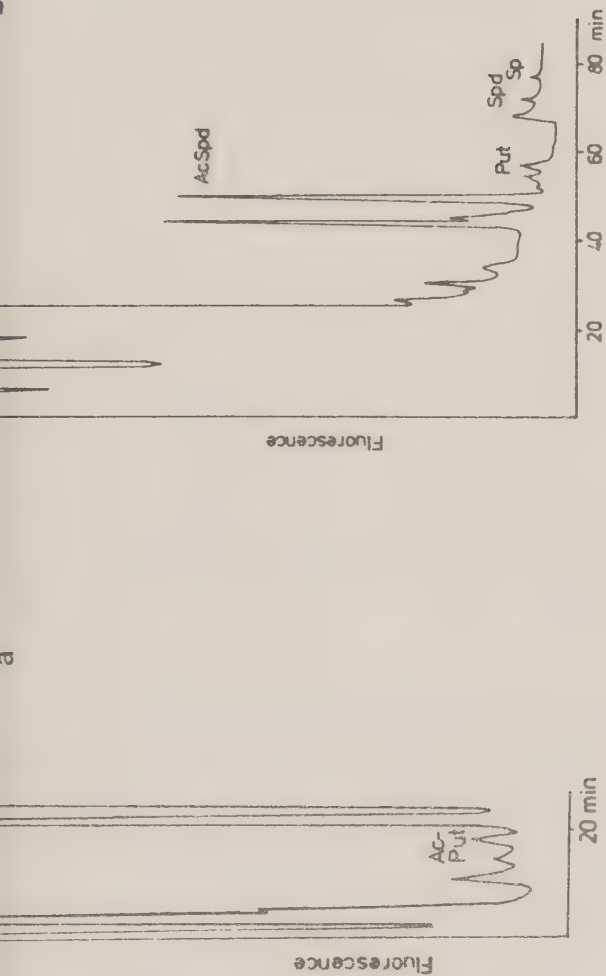


Abb. 4.12. Chromatogramm einer Urinprobe

a) 10 μ l Urin (Verdünnung B) wurden für die Bestimmung von Acetylputrescin aufgetragen

b) 150 μ l Verdünnung A. Das Programm wurde mit Puffer 2 gestartet.

nicht wieder getrennt werden können. Ein Verfahren zur längerfristigen Stabilisierung des Urins konnte bisher nicht gefunden werden. Eine Verringerung der Verluste auf etwa 10% innerhalb von 7 Tagen wurde erreicht durch Lyophilisieren des Urins unter Zusatz von 0.1 N HCl und Äthanol und der anschließenden Lagerung in Puffer 1 pH 1.9 bei -20°C .

Die hier beschriebene Methode ermöglicht es, die freien Polyamine und ihre acetylierten Derivate im Urin von Gesunden und Kranken ohne vorherige Reinigung zu bestimmen. Sensibilität und Präzision der Methode sind ausreichend, um auch an limitiertem Probenmaterial (5 - 10 mg Gewebe) zuverlässig die Konzentration der Polyamine bestimmen zu können. Durch die Verwendung eines automatisierten Analysators ist die Möglichkeit der routinemäßigen Untersuchung der Polyamine gegeben. Bei der Analysendauer von 120 min./Probe können 10 Proben pro Tag untersucht werden.

4.3. S-Adenosylmethionin- abhängiger Stoffwechsel von Polyaminen in *Dictyostelium discoideum*

Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* stellt ein einfaches Modellsystem dar, an dem biochemische Veränderungen zu verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden können. In der Natur wächst er in Assoziation mit Bakterien.

Die Versuche dieser Arbeit wurden mit dem axenisch wachsenden Stamm Ax-2 durchgeführt, der im Labor in einem Maximalmedium gezüchtet werden kann. Vegetative Amöben wachsen logarithmisch mit einer Generationszeit von 8 - 10 Stunden bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml, die maximal erreichbare Zelldichte liegt bei etwa 2×10^7 Zellen/ml. Die Entwicklung zu Sporen kann durch

Entzug des Nährmediums induziert werden, wobei alle Zellen nahezu synchron in die Entwicklungsphase eintreten. Die Zellen werden vom Medium abzentrifugiert und entweder mit einer Dichte von etwa 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer (3.3.1.) suspendiert oder auf Agarplatten mit einer Dichte von etwa 0.5×10^7 Zellen/cm² ausgestrichen. Etwa 5 - 6 Stunden nach Nahrungsentzug bilden die Zellen Aggregate und durchlaufen gut definierte Entwicklungsstadien. Nach etwa 26 Stunden endet die Entwicklung mit der Ausbildung von Sporen (Abb. 4.13.).

Werden vegetative Amöben in Phosphatpuffer suspendiert und ca. 8 Stunden geschüttelt, erreichen die Zellen ein Stadium, das als Preaggregationsstadium bezeichnet wird und das dem Zustand nach etwa 5 - 6 Stunden Entwicklung auf Agar entspricht. Da die Zellen nicht weiter aggregieren, wird die Entwicklung in einem definierten Zustand gehalten und die biochemischen Veränderungen während des Preaggregationsstadiums können untersucht werden.

Neben den morphologischen Veränderungen äußert sich der Entwicklungsprozeß auch in drastischen Änderungen in der molekularen Zusammensetzung der Zellen zu verschiedenen Stadien (Abb. 4.14.).

Die Differenzierung der Amöben zu Stütz- und Sporenzellen und die morphologisch gut definierten Zustände im Lebenszyklus machen *Dictyostelium disc.* zu einem geeigneten Modellsystem zum Studium biochemischer Veränderungen zu verschiedenen Stadien des Wachstums und der Entwicklung.

4.3.1. Polyaminspiegel

Zellwachstum und Zellproliferation stehen in engem Zusammenhang mit einer erhöhten Synthese und der Anreicherung von Polyaminen in der Zelle. Dies wurde von mehreren Arbeitsgruppen an verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen (zusammenfassend beschrieben bei: Tabor u. Tabor 1976;

THE LIFE CYCLE OF THE CELLULAR SLIME MOLD

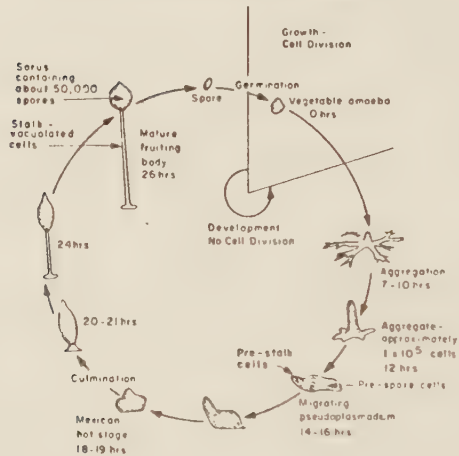


Abb. 4.13.

Lebenszyklus des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*.

	Amoebae	Fruiting bodies
Dry weight (mg 10^8 cells)	5-8	2.5-4
Protein (mg 10^8 cells)	2-5	1.5-2
RNA (mg 10^8 cells)	1	0.4
Total carbohydrate (mg 10^8 cells)	0.5	0.4
Cellobiose (mg 10^8 cells)	0	0.1
Mucopolysaccharide (mg 10^8 cells)	0	0.08
Trehalose (mg 10^8 cells)	0	0.15
DNA (μ g 10^8 cells)	36	30

Abb. 4.14.

Änderungen einiger Makromoleküle während der Entwicklung von *Dictyostelium disc.* Die Angaben beziehen sich auf den *Dictyostelium*-Stamm NC-4 (Loomis 1975).

Jänne et al. 1978). So steigt die Polyaminkonzentration in Lymphozyten, die mit Concanavalin A stimuliert werden, nach 8 Stunden auf das 5 - 10fache an (Fillingame et al. 1973). Die DNA-Synthese in den Zellen beginnt nach 24 Stunden. Durch α -Methyl-Ornithin, einen reversiblen kompetitiven Hemmstoff der Ornithindecaboxylase (ODC), und Methylglyoxalbis(guanylhydrazon) (MGBG), einem Hemmstoff der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC), wird die DNA-Synthese in den Zellen gehemmt. Das Ausmaß der Hemmung ist abhängig von der Polyaminkonzentration in der Zelle (Morris 1978). Bei Verwendung von α -Difluor-Methylornithin, einem irreversiblen Hemmstoff der ODC werden auch die RNA- und Proteinsynthese betroffen (Hölldt et al. 1979).

In Dictyostelium ist der Beginn der Entwicklungsphase durch drastische Änderungen im Stoffwechsel von DNA, RNA und Protein gekennzeichnet. Die DNA-Synthese wird gestoppt, ein Teil der Polysomen zerfällt innerhalb von 10 min., es treten neue mRNAs auf, die für entwicklungsspezifische Proteine codieren, andere mRNAs werden nicht mehr translatiert.

Die Bestimmung der Polyamine während des vegetativen Wachstums und im frühen Stadium der Entwicklung sollte klären, ob ein Zusammenhang besteht zwischen ihrer Konzentration in der Zelle und den beobachteten Veränderungen im Stoffwechsel von Nukleinsäuren und Proteinen. Die Analysen wurden an vegetativ wachsenden Zellen und während der ersten 8 Stunden der Entwicklung in einer Suspensionskultur durchgeführt.

Da sich in einer Suspension durch die Aggregation der Zellen die Zellzahl nicht sehr genau ermitteln läßt, wurden als Bezugsgrößen RNA und Protein gewählt.

Polyamingehalt während des vegetativen Wachstums.

Während des vegetativen Wachstums wurden bei Zelldichten zwischen 1×10^6 und 7×10^6 Zellen/ml einer 200 ml Kultur je 10 ml entnommen. Die Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung von Polyaminen, RNA und Protein ist in 3.10. beschrieben.

Bei der genannten Zelldichte sind die Konzentrationen von Protein und RNA nahezu konstant. Aus acht verschiedenen Aufschlüssen wurde ein Proteingehalt von 5.07 mg pro 10^8 Zellen und ein RNA-Gehalt von 1.85 mg pro 10^8 Zellen ermittelt (Tab. 4.4.). Diese Werte stimmen mit den von Rummel (1977) angegebenen überein. Die Polyaminkonzentrationen in den Zellen sind - bezogen auf Protein und RNA - nahezu konstant. Die stärksten Schwankungen weist 1,3 Diaminopropan mit 65.4 ± 10.1 nmol/mg Protein auf (Tab. 4.5.). Die ermittelten Polyaminmengen entsprechen einer durchschnittlichen zellulären Konzentration von 7.0 mM 1,3 Diaminopropan, 10.5 mM Putrescin und 1.6 mM Spermidin.

Zelldichte $\times 10^{-6}/\text{ml}$	mg Protein/ 10^8 Zellen	mg RNA/ 10^8 Zellen
1.5 - 7.2	5.07 ± 0.71	1.85 ± 0.16

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Tab. 4.4.

Protein- und RNA-Gehalte von Dictyostelium discoideum während des vegetativen Wachstums.

Polyamingehalte während des frühen Stadiums der Entwicklung.

Zunächst wurden Zellen der vegetativen Wachstumsphase bei einer Zellzahl von 4×10^6 /ml abzentrifugiert und mit einer Dichte von 1×10^7 /ml in Phosphatpuffer (3.2.1.) suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden zu den angegebenen Zeiten je 10 ml entnommen und Polyamine, sowie RNA und Protein aus der gleichen Probe bestimmt (siehe 3.10.).

Der Proteingehalt nimmt während der ersten 8 Stunden des Mangels von 5 mg auf 4 mg pro 10 ml Zellsuspension ab. Dies entspricht einer Abnahme von 20%. Zu dieser Zeit ist der RNA-Gehalt der Zellen auf 50% der ursprünglichen Menge gesunken (Abb. 4.15.).

Die Konzentrationen der Polyamine verändern sich im frühen Stadium der Entwicklung verschieden. Der Gehalt an Putrescin steigt während der ersten zweieinhalb Stunden - bezogen auf 1 mg Protein - von 92.3 nmol auf 112.0 nmol und fällt danach auf 59.7 nmol. Dies entspricht 65% der ursprünglich vorhandenen Menge. Die Diaminopropankonzentration zeigt einen ähnlichen Verlauf, die Schwankungen sind jedoch geringer (62.9 nmol - 83.4 nmol - 54.4 nmol). Spermidin nimmt von Anfang an ab. Die Konzentration sinkt innerhalb der ersten 8 Stunden der Entwicklung von 19.8 nmol/mg Protein auf 10.1 nmol/mg Protein. Das Verhältnis Polyamin/RNA ist bis 4 Stunden nach Beginn der Entwicklung ähnlich dem Polyamin/Protein-Verhältnis. Auf Grund der stark erniedrigten RNA-Konzentration nach 7,5 Stunden Entwicklung ist jedoch zu diesem Zeitpunkt ein höheres Polyamin/RNA-Verhältnis zu finden als zu Beginn der Entwicklung (Abb. 4.16.).

Zeit der Entwicklung:	0	8	Stunden
Diaminopropan	217.3	412.9	nmol/mg RNA
Putrescin	272.3	450.4	"
Spermidin	58.6	80.5	"

Polyamin	nmol/mg Protein	nmol/mg RNA
1,3 Diaminopropan	65.4 $\pm$ 10.1	190.0 $\pm$ 16.5
Putrescin	112.3 $\pm$ 8.6	329.7 $\pm$ 27.1
Spermidin	25.7 $\pm$ 2.5	74.9 $\pm$ 3.5
Zelldichte 1.5 - 7.2 x 10 ⁶ /ml		

Tab. 4.5.
 Polyamingehalt von Dictyostellium disc. während des vegetativen Wachstums
 Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (n = 8).

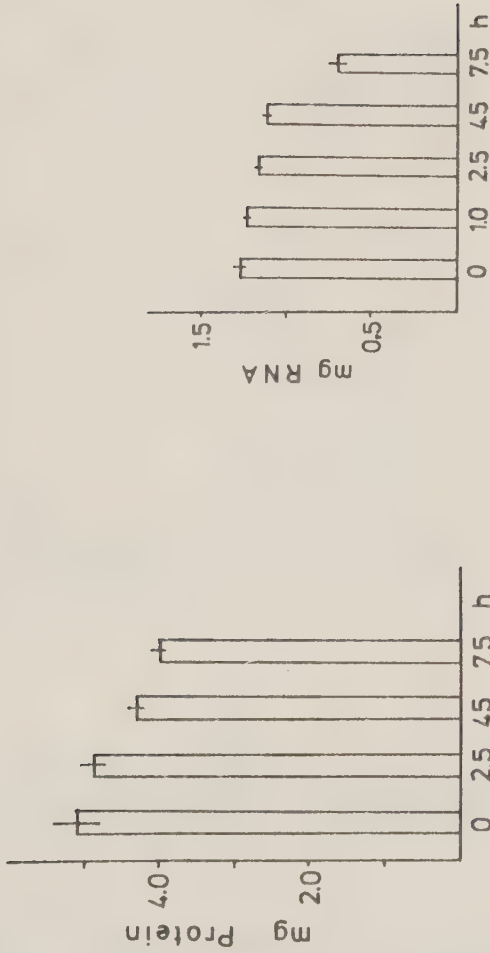


Abb. 4.15. Protein und RNA Gehalte von Dictyostelium disc. während der Entwicklung (0 - 8 Stunden in Phosphatpuffer (3.3.1.) geschüttelt). Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in Puffer suspendiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 10 ml entnommen und nach 3.10. analysiert.

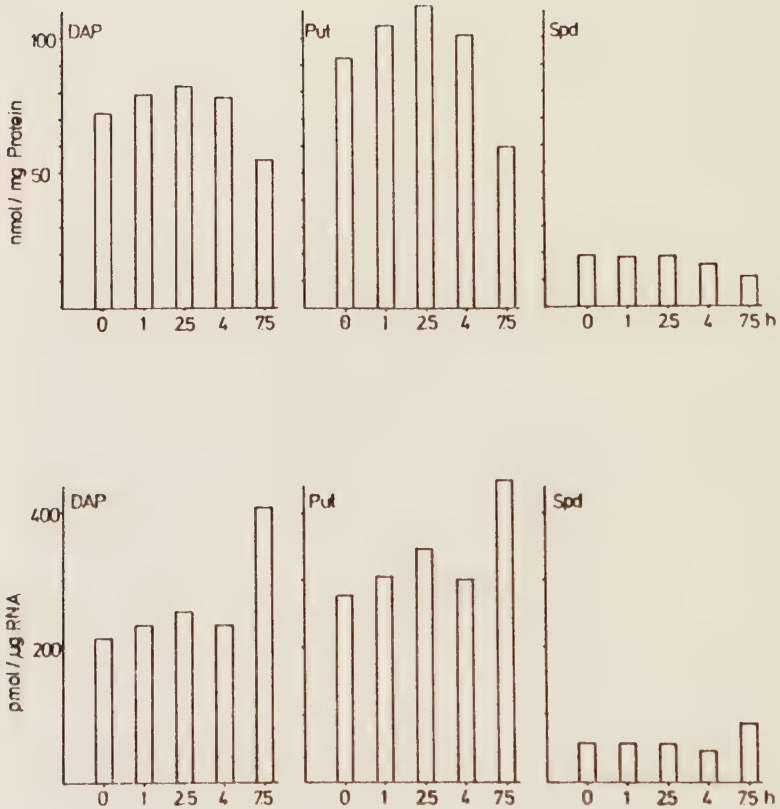
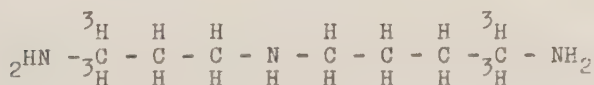


Abb. 4.16.

Polyamingehalte (bezogen auf mg Protein bzw. ug RNA) in Dictyostelium (Preaggregation, 0 - 8 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt).

4.3.2. Entstehung von 1,3 Diaminopropan aus Spermidin

Die Putrescin- und Spermidingehalte von *Dictyostelium* sind vergleichbar mit denen anderer niederer Eukaryonten wie *Physarum polycephalum* (Mitchell et al. 1973) oder *Blastocladiella emersonii* (Menucci et al. 1975). Die Biosynthesen der beiden Amine verlaufen in *Dictyostelium* ausschließlich über die Decarboxylierung von Ornithin durch die Ornithindecaboxylase (Turner und North 1977). Der hohe Gehalt an Diaminopropan in *Dictyostelium* ist ungewöhnlich. Außer der Alge *Euglena gracilis*, die ebenfalls millimolare Konzentrationen von Diaminopropan enthält (Aleksijevic et al. 1979), kommt dieses Diamin nur in sehr geringen Mengen in Microorganismen vor. Pflanzen und Microorganismen besitzen für die Synthese eine Polyaminoxidase, die Spermidin in 1,3 Diaminopropan und -aminobutyraldehyd umwandeln kann. In höheren Eukaryonten können durch die Oxidation von Spermidin Putrescin und Aminopropionaldehyd gebildet werden. Welcher Metabolit aus Spermidin in *Dictyostelium* entsteht, wurde durch eine Markierung der Zellen mit radioaktivem Spermidin untersucht, dessen endständige Methylengruppen tritiiert waren.



Während des vegetativen Wachstums und der Preaggregation wurden die Zellen mit je 10 uCi ${}^3\text{H}$ -Spermidin markiert. Zwei, vier und sechs Stunden nach der Zugabe wurden die Polyamine extrahiert und analysiert.

Das zugesetzte Spermidin wurde in beiden Lebensstadien in 1,3 Diaminopropan umgewandelt (Abb. 4.17.).

Im Medium konnte während des vegetativen Wachstums kein Diaminopropan nachgewiesen werden. Während der Entwicklung finden sich alle drei in Dictyostelium vorkommenden Polyamine im Differenzierungspuffer (Abb. 4.18.).

Der parallele Anstieg von Putrescin und Spermidin im Differenzierungspuffer könnte durch absterbende Zellen verursacht werden. Der wesentlich steilere Anstieg der Diaminopropankonzentration kann nur durch eine zusätzliche Abgabe von Diaminopropan aus intakten Zellen erklärt werden. Die Funktion des Diaminopropans und der Mechanismus der Ausschleusung aus den Zellen sind nicht bekannt.

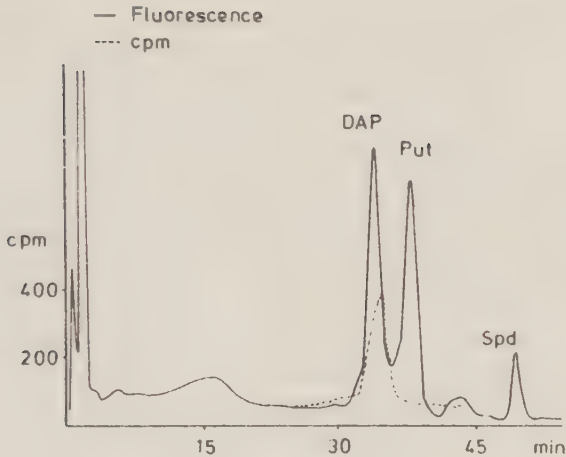


Abb. 4.17.

Umwandlung von Spermidin in 1,3 Diaminopropan in *Dictyostelium discoideum* während des vegetativen Wachstums.

Eine 5 ml Kultur wurde bei einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml mit 10 uCi ^3H -Spermidin (43 Ci/mmol) markiert. Nach 2,4 und 6 Stunden wurde je 1 ml entnommen, die Polyamine mit TCA (10%) extrahiert und analysiert, Das Eluat der Polyaminbestimmung wurde in 0.5 min. Fraktionen gesammelt und die gesamte Fraktion in 5 ml Dioxanszintillator gezählt. Die Analysen der verschiedenen Lebensstadien zeigten nur quantitative Unterschiede.

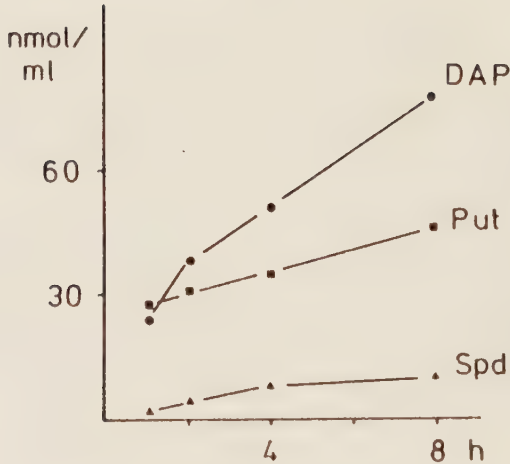


Abb. 4.18.

Auftreten von Polyaminen im Phosphatpuffer in Suspensionskulturen von *Dictyostelium* während der Preaggregation.

In 1 ml Phosphatpuffer (3.2.1.) wurden 1×10^7 Zellen suspendiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 200 μ l entnommen. Die Zellen wurden 3 min. bei $3000 \times g$ abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 μ l entnommen und mit 100 μ l TCA (10%, 1 Stunde bei 4°C gerührt. Vom Überstand der anschließenden Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 10 min.) wurden 100 μ l für die Polyaminanalysen eingesetzt.

4.4. S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung von tRNA in Dictyostelium disc.

Änderungen in den Aktivitäten von tRNA-Methyltransferasen und dem Methylierungsmuster der tRNA werden in einigen Fällen beobachtet, wenn Organismen oder Gewebe physiologische oder pathologische Veränderungen erfahren (zusammenfassend beschrieben bei Nau 1976).

Bei Dictyostelium disc. sinkt die Gesamtaktivität aller Methyltransferasen - gemessen in einem Zellextrakt - innerhalb der ersten 8 Stunden der Entwicklung auf 60%, verglichen mit vegetativen Zellen (Pillinger und Borek 1969). In unserem Arbeitskreis wurde gezeigt, daß der Ribothymidingehalt der tRNA von 0.87 Mol% in der vegetativen Phase auf 0.60 Mol% nach 8 Stunden Mangel in Phosphatpuffer sinkt (Dingermann et al. 1977). Für einige andere modifizierte Nukleoside in der tRNA wurden geringere Veränderungen festgestellt.

Zur Bestimmung der modifizierten Nukleoside wurde die Gesamt-tRNA aus den Zellen isoliert und zu Nukleosiden abgebaut. Die Nukleoside wurden nachträglich mit Tritium markiert (Randerath 1972).

Einige Nukleoside, wie zum Beispiel am 2'OH der Ribose methylierte Ribonukleoside, können mit dieser Methode nicht erfaßt werden.

In dieser Arbeit wurde versucht zu klären, ob während der Entwicklung von Dictyostelium disc. Veränderungen in der Synthese von methylierten Nukleosiden auftreten, die mit der Methode von Randerath nicht erfaßt werden können, und ob bestimmte tRNA-Spezies betroffen sind.

Zur Klärung dieser Fragen wurden die Zellen mit Methyl-³H-Methionin markiert und die Gesamt-tRNA zweidimensional gelelektrophoretisch getrennt.

4.4.1. Trennung spezifischer tRNAs.

Mit der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese läßt sich Gesamt-tRNA in einem Analysenschritt in nahezu alle spezifischen tRNAs auftrennen.

Die Methode wurde erstmals von Fradin et al. 1975 beschrieben. Sie wurde von mir in Zusammenarbeit mit Th. Dingermann modifiziert und zur Trennung von Gesamt-tRNA von Dictyostelium disc. eingesetzt.

Aus vegetativen Amöben und Zellen des Entwicklungsstadiums wurde Gesamt-tRNA präpariert (3.4.) und durch Gelelektrophorese zweidimensional getrennt. In Abb. 4.19. sind die typischen Verteilungsmuster zu sehen. Danach läßt sich Gesamt-tRNA in etwa 40 Flecken auftrennen. Einige Flecken enthalten mehr als eine tRNA-Spezies (Dingermann 1980).

Der Nachweis der tRNAs durch Färbung mit Ethidiumbromid erlaubt keine quantitative Aussage, qualitativ unterscheiden sich die tRNA-Muster aus Zellen der vegetativen und der frühen Entwicklungsphase nicht.

Die gleichen Beobachtungen wurden von Palatnik et al. 1977 gemacht, der Gesamt-tRNA aus Dictyostelium mit Hilfe von analytischen RPC-5 Läufen an einer Hochdruckflüssigkeits-säule untersucht hat. Dabei wurden nur bei einigen tRNA-Isoacceptoren quantitative Veränderungen festgestellt.

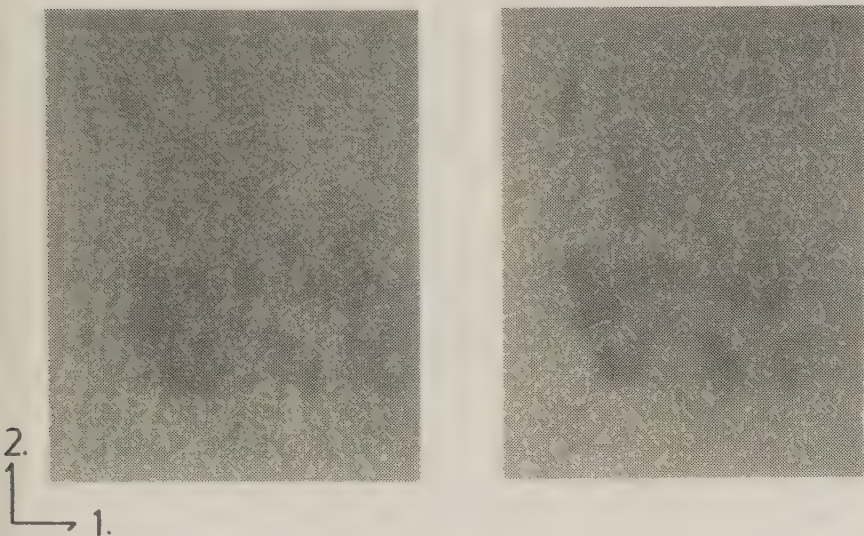
4.4.2. Neusynthese und Methylierung von tRNA zu bestimmten Entwicklungsphasen.

Ob das Verteilungsmuster der während der frühen Entwicklung neu synthetisierten tRNAs verändert ist, wurde durch radioaktive Markierungen der Zellen untersucht.

Die Markierung der Zellen mit 32 Phosphor zeigt, daß bereits während der ersten 30 min. der Entwicklung sämtliche tRNAs, die sich im optischen Bild erkennen lassen, neu synthetisiert sind. Während der ersten 3 Stunden der Entwicklung lassen sich keine Unterschiede in der Synthese der einzelnen tRNA-

Abb. 4.19.

Muster von Dictyostelium Gesamt-tRNA nach zweidimensionaler Gelelektrophorese.



Je 0.5 A₂₆₀ Gesamt-tRNA wurden zweidimensional gelelektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden mit einer Lösung von 0.5% Ethidiumbromid im Elektrophoresepuffer 3 min. gefärbt und unter UV-Anregung fotografiert. 1.Dim.: von links nach rechts, 2.Dim.: von unten nach oben.

a) tRNA aus dem vegetativen Wachstumsstadium

b) tRNA aus dem Entwicklungsstadium nach 14 Stunden in Phosphatpuffer.

Spezies feststellen (Abb. 4.20.).

Dies ist bemerkenswert, da die bisher gemessenen Halbwertszeiten von tRNA bei etwa 60 Stunden liegen (Abelson et al. 1974, Schlegel et al. 1978). Die noch aus der vegetativen Phase vorhandenen tRNAs könnten demnach für den 24 Stunden dauernden Entwicklungszyklus ausreichen.

Mit ^3H -Uridin bzw. Methyl- ^3H -Methionin Markierungen der Zellen wurde geprüft, ob die in der Preaggregation neu synthetisierten tRNAs auch methyliert werden.

Der Vergleich der Fluorographien mit dem optischen Bild zeigt, daß der Einbau von Uridin und Methionin während der ersten 12 Stunden der Entwicklung in alle nachweisbaren tRNA-Spezies erfolgt (Abb. 4.21.).

4.4.3. Neusynthese spezifischer methylierter Nukleoside.

In Eukaryonten wurden tRNAs gefunden, die sich bei gleicher Primärstruktur nur durch spezifische Modifikationen an bestimmten Positionen unterscheiden. Es kommen auch unvollständig modifizierte Nukleoside in einer tRNA-Spezies vor. Nach Roe (1977) lassen sich tRNAs in Bezug auf ihre Modifikation in der GT $\emptyset$ C Schleife (Abb. 2.4.) in vier Klassen einteilen:

Klasse	Nukleosid an Position 54
A	A (eukaryontische Initiator tRNAs)
B	rT, $\emptyset$, Tm
C	zum Teil rT, zum Teil U
D	U

Die tRNAs der Klasse C enthalten in der gleichen Molekülspezies zum Teil rT und zum Teil U.

Die beobachtete Abnahme des rT Gehaltes im frühen Stadium der Entwicklung und der verminderte Gehalt in Sporen von

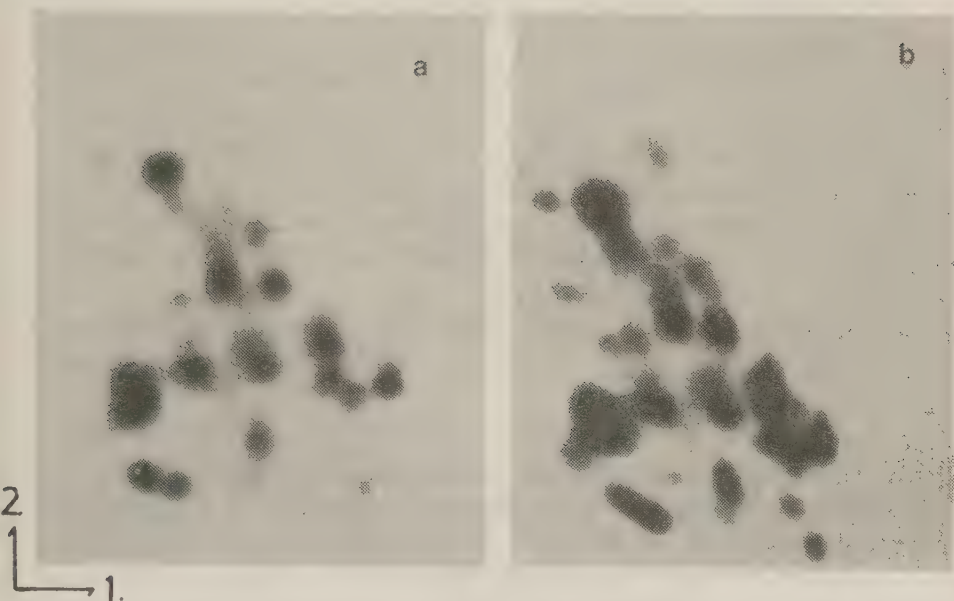


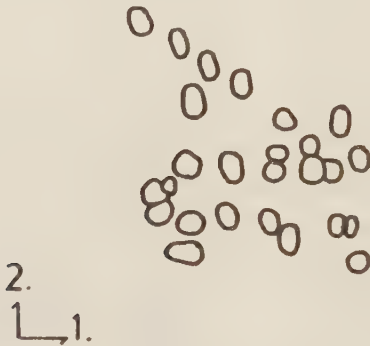
Abb. 4.20.

Neusynthese von tRNA während der frühen Entwicklung.

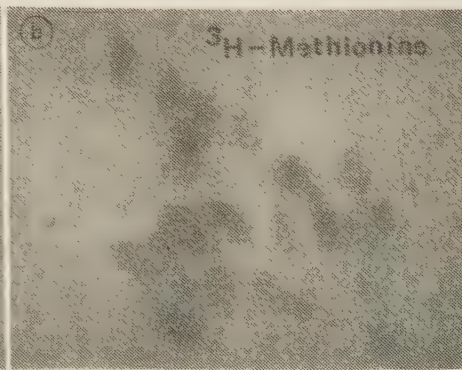
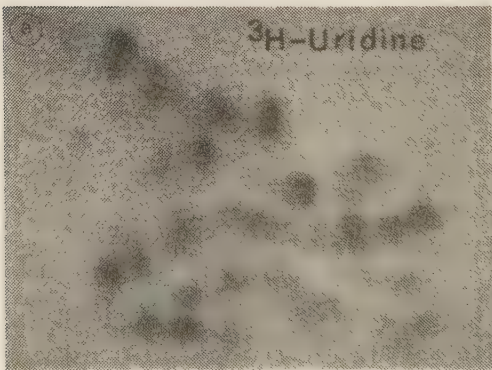
5×10^7 Zellen wurden in 5 ml Puffer suspendiert (20 mM KCl, 5 mM MgSO_4 , 7 mM MES pH 6.5). Die Zellen wurden mit 1 mCi ^{32}P markiert. Nach 30 min., 1 h und 3 h wurden je 1 ml entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 200 μl TMS-Puffer (3.4.1.) suspendiert. Es wurden 200 μl 1% Triton X 100 in TMS-Puffer zugegeben und 1min. geschüttelt. Nach der Zugabe von 400 μl TMS-Puffer/Phenol 1:1 wurde 30 min. bei 4°C gerührt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt, die wässrige Phase einrotiert und die tRNAs zweidimensional gelelektrophoretisch getrennt. (a) tRNAs nach 1 Stunde Markierung, (b) tRNAs nach 3 Stunden Markierung.

Abb. 4.21.

Gelelektrophoretische Bestimmung von in vivo mit ^3H -Uridin oder Methyl- ^3H -Methionin markierten tRNAs aus Zellen der Preaggregationsphase.



Schematische Darstellung der mit Methylenblau angefärbten tRNAs aus Versuch a bzw. b. Das optische Bild der Trennungen war identisch.



Fluorographie der Gele.

Je eine 4 ml Kultur mit 2×10^7 Zellen/ml wurde während der ersten 12 h der Preaggregation mit 2 mCi ^3H -Uridin (a) oder 3 mCi ^3H -Methionin (b) markiert. Die tRNAs wurden nach 3.4. isoliert. 2.5 A_{260} tRNA mit 1.7×10^5 cpm (a) bzw. 2.4 A_{260} mit 1×10^5 cpm wurden aufgetragen. Die Gele wurden mit Szintillator behandelt und 10 Tage bei -80°C exponiert.

Dictyostelium disc. könnte auf einer vermehrten Synthese von U-haltigen tRNAs beruhen, die zur Klasse C gehören. Eine zweite Möglichkeit wäre das Auftreten von Ribose-methyliertem Ribothymidin (Tm).

Welcher Mechanismus für den verringerten rT Gehalt der "Entwicklungs-tRNA" verantwortlich ist, sollte durch die Bestimmung der Neusynthese der methylierten Basen in verschiedenen Entwicklungsstadien geklärt werden.

Synthese von methylierten Nukleosiden während der Pre-aggregation.

Je eine 4 ml Kultur mit 2×10^7 Zellen/ml wurde während der ersten 6 bzw. 12 Stunden Entwicklung in Phosphatpuffer mit 1 mCi Methyl- ^3H -Methionin markiert. Die tRNA wurde isoliert, durch DEAE und Sephadex G 100 Chromatographie gereinigt und zu Nukleosiden verdaut. Die Nukleoside wurden im System von Rogg (1976) getrennt.

Synthese von methylierten Nukleosiden während einer späten Entwicklungsphase (Postaggregation).

Zur Bestimmung der Synthese von methylierten Nukleosiden in einem späteren Entwicklungsstadium wurden die Zellen auf Filtern ausgestrichen. Nach 14 Stunden wurden die Zellen mit 1 mCi Methyl- ^3H -Methionin markiert (3.3.) und nach 17 Stunden die tRNA isoliert (3.4.2.). Für die Nukleosidanalysen wurden die Systeme von Rogg und RhajBhandary (1979) verwendet.

In den untersuchten Entwicklungsstadien wurden folgende neusynthetisierte methylierte Nukleoside nachgewiesen (Abb. 4.22.):

7-Methylguanosin (m^7G)
2-Methylguanosin (m^2G)
1-Methylguanosin (m^1G)
 N^2-N^2 -Dimethylguanosin (m^2_2G)
2'O-Methylguanosin (Gm)
5-Methyluridin/Ribothymidin (m^5U , rT)
2'O-Methylcytidin (Cm)
2'O-Methyluridin (Um)
2'O-Methylribothymidin (Tm)
3-Methylcytidin (m^3C)
1-Methyladenosin (m^1A)
5-Methylcytidin (m^5C)

In der tRNA aus Zellen der späten Preaggregation und des "mexican hat" Stadiums tritt als neues Nukleosid 2'O-Methylribothymidin (Tm) auf.

Der Gehalt von Tm steigt von 0.6% in der Preaggregation auf etwa 10% im Postaggregationsstadium an (Tab. 4.6.). Der Anteil des Ribothymidins sinkt von etwa 14% in der Preaggregations-tRNA auf etwa 7% in der tRNA aus dem späten Entwicklungsstadium.

Die Veränderungen im Gehalt von m^2_2G , m^7G und Gm deuten darauf hin, daß die tRNAs, die während der Entwicklung synthetisiert werden, nicht nur in Bezug auf Ribothymidin ein verändertes Modifikationsmuster aufweisen. Die erhöhten Syntheseraten von m^2_2G in der späten Entwicklungsphase sind in Übereinstimmung mit erhöhten m^2_2G Werten der Gesamt-tRNA, die durch Randerath Analysen aus dem gleichen Stadium ermittelt wurden (Ergebnisse von F. Pistel in unserer Arbeitsgruppe).

Das Auftreten von 2'O-Methylribothymidin während der Entwicklung kann, zumindest teilweise, den verminderten rT Gehalt der Gesamt-tRNA aus dem Entwicklungsstadium erklären. (In der tRNA aus der vegetativen Wachstumsphase konnte kein Tm nachgewiesen werden.) Das Vorkommen von Tm in der "Entwicklungs-tRNA" kann zurückzuführen sein:

- i) auf eine Hypermethylierung von tRNAs mit rT durch ein entwicklungsspezifisches Enzym

ii) auf die Synthese neuer tRNA-Spezies, die Tm an Stelle von rT oder U an der Position 54 besitzen.

Quantitative Aussagen sind nicht möglich, da die Synthese der U⁵⁴-haltigen tRNAs nicht gemessen werden kann. Versuche, diese tRNAs durch eine spezifische Nachmethylierung in vitro zu erfassen, verliefen negativ.

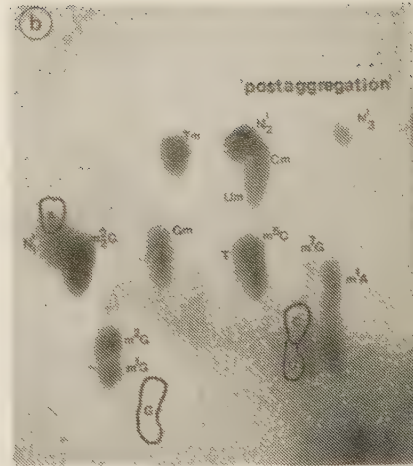
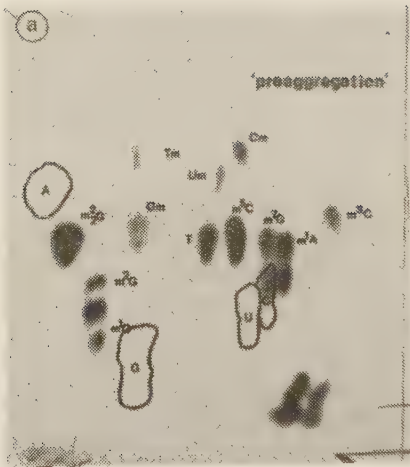


Abb. 4.22.

Chromatographische Trennung der methylierten Nukleoside,
die während der Entwicklung synthetisiert werden.

3 A₂₆₀ Einheiten tRNA mit 1.2×10^5 cpm (a) und 1.5 A₂₆₀ Einheiten tRNA mit 1.6×10^5 cpm (b) wurden nach Rogg (1976) verdaut und dünn-schichtchromatographisch getrennt.

Zeitraum der					
Markierung	0 - 6 h		0 - 14 h		14 - 17 h
Nukleosid	%		%	%	%
m^2_2G	8.0		12.1	13.7	15.7 16.3
m^2G+m^1G	18.6		17.6	19.4	19.4 22.7
m^7G	5.6		7.0	-	2.8 -
Gm	16.8		10.6	8.6	7.8 8.2
T			11.9	15.6	7.5
m^5C			23.7	29.2	14.5
$T+m^5C$	33.1		(35.6)	(44.8)	22.0 (22.0)
Tm	-		0.6	0.6	13.8 8.4
Um	5.3		2.8	2.6	4.3 8.5
Cm	8.6		5.1	4.2	7.0 7.7
m^1A	3.7		6.3	5.9	6.9 5.3
m^3C	-		2.1	-	- -
	+		+	+	+

Tab. 4.6.

Synthese von methylierten Nukleosiden während der Entwicklung

+ Nukleosidanalyse nach Rogg

o Nukleosidanalyse nach RhajBhandary

4.5. Polyamine und tRNA-Methyltransferaseaktivitäten in Dictyostelium disc.

Die Aktivität von Gesamt-tRNA Methyltransferasen aus Tumorgewebe ist höher als die Aktivität aus vergleichbarem gesundem Gewebe (zusammenfassende Lit. bei Nau 1976). Basenanalysen von tRNAs aus neoplastischem und gesundem Gewebe ergaben quantitative Unterschiede in einzelnen Modifikationen (Randerath 1974, Nau 1974).

Bei in vitro Versuchen mit tRNA aus E. coli als Substrat und Enzymextrakten aus Rattenleber wurde gefunden, daß die Methylierungsreaktion in vitro von Kationen abhängig ist, und durch Polyamine stimuliert werden kann. Magnesium- oder Natriumionen haben nur etwa 50% der Aktivität der Polyamine.

Da in neoplastischem Gewebe die Polyaminkonzentrationen erhöht sind (Jänne et al. 1978), könnte die gesteigerte Aktivität der Methyltransferasen in Tumorgewebe auf eine Erhöhung der Polyaminkonzentrationen zurückzuführen sein.

In unserem Modellsystem Dictyostelium disc. ändern sich während der Entwicklung die Polyamingehalte und die Methylierungsmuster der tRNA. Es lag daher nahe, zu prüfen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Aktivität verschiedener tRNA Methyltransferasen und den Polyamingehalten in der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung.

In den tRNAs von Eukaryonten gibt es eine Reihe von Modifikationen, die in Prokaryonten nicht vorkommen. Prokaryontische tRNAs sind daher geeignete Substrate für tRNA Methyltransferasen aus Eukaryonten.

4.5.1. Einfluß von Polyaminen auf die Gesamt-tRNA Methyltransferaseaktivität in vitro.

Alle Methylierungsversuche wurden mit Gesamt-tRNA aus

dem E. coli Stamm 1B-5 als Substrat durchgeführt (Björk 1970). Diesem Stamm fehlt das Ribothymidin-bildende Enzym, so daß sich in der tRNA an Position 54 immer ein unmodifiziertes Uridin findet. Die tRNA wurde in unserem Labor isoliert.

Methyliert wurde mit dem in 3.7. beschriebenen Ansatz.

Die Methylierungsreaktion mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Cosubstrat und tRNA als Substrat hat im Vergleich mit anderen Enzymreaktionen einige Besonderheiten. Für verschiedene tRNA Methyltransferasesysteme wurde eine Substrathemmung beobachtet (m^5U , m^7G). Auch das bei der Reaktion entstehende S-Adenosylhomocystein hemmt, es hat einen K_i , der mit $0.3 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-6} M$ in der gleichen Größenordnung liegt, wie der K_m Wert des SAMs ($1.5 - 3 \times 10^{-6} M$). Daher muß mit möglichst wenig Substrat und möglichst hohem Cosubstratüberschuß gearbeitet werden, um eine optimale Inkorporation von Methylgruppen zu erreichen. Optimale Bedingungen sind Abb. 4.23. zu entnehmen.

Um die für die Methylierung von tRNA aktivste Proteinfraction zu finden, wurden S-30 und S-78 Überstände von Zellextrakten der gleichen Zellpopulation getestet. Die Enzyme wurden durch Chromatographie an DEAE-Cellulose von tRNA befreit. Die S-78 Fraktionen enthielten bei zwei verschiedenen Enzympräparationen jeweils nur etwa 60% der Kapazität des 30 000 x g Überstandes. Als Kapazität wird in diesem Zusammenhang das Ausmaß der Inkorporation aller Methylgruppen in die Gesamt-tRNA bezeichnet.

Zellextrakt	pmol CH_3/A_{260} tRNA			
	S_{30}		S_{78}	
	60'	120'	60'	120'
1)	1208	1960	686	1100
2)	967	2077	620	1286

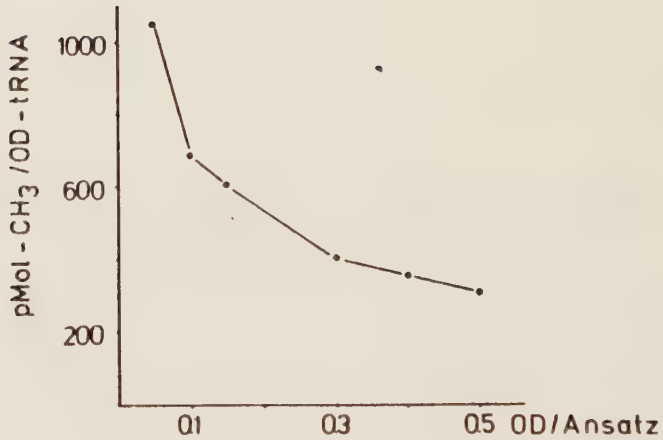


Abb. 4.23.

Methylierung von Gesamt-tRNA aus E.coli IB-5 in Abhängigkeit von der tRNA Konzentration.

Verschiedene Mengen tRNA wurden im Standardansatz (3.7.) mit je 20 nmol SAM und 200 ug Enzymextrakt aus vegetativen Dictyostelium Zellen 2 Stunden methyliert.

Polyaminkonzentration im Ansatz: 2 mM Spermidin.

Die folgenden Versuche wurden daher mit einem S-30 Überstand durchgeführt.

Ieboy (1970) hat gezeigt, daß der Einfluß von Polyaminen auf die Methylierung von tRNA in vitro durch Mg^{2+} antagonisiert werden kann. Daher wurde der Enzymextrakt im letzten Präparationsschritt gegen einen magnesiumfreien Puffer dialysiert (3.6.), die tRNA wurde nicht behandelt. Unter diesen Bedingungen ist die Magnesiumkonzentration im Ansatz so gering, daß keine Inkorporation von Methylgruppen in tRNA gemessen werden kann.

Eine für Polyamine typische Methylierungskinetik zeigt Abb. 4.24.

Testet man unter den Standardbedingungen den Einfluß der in Dictyostelium disc. vorkommenden Polyamine auf die Methylierungsreaktion, so ergibt sich, daß Polyamine sowohl aktivieren als auch hemmen können (Abb. 4.25.). Die optimale Methylgruppeninkorporation in die tRNA wurde bei Polyaminmengen von 1 - 2 mM Spermidin und 10 mM Putrescin gemessen. Dies entspricht genau den in vivo gefundenen Konzentrationen (Spermidin: 1.6 mM, Putrescin: 10.5 mM). Die Versuche wurden mit sechs verschiedenen Enzymextrakten reproduziert.

1,3 Diaminopropan, das neben Spermidin und Putrescin in Dictyostelium vorkommt, zeigt einen wesentlich geringeren Effekt auf die Gesamt-tRNA Methyltransferasen. Die maximale Stimulierung wird durch eine Konzentration von 20 mM im Ansatz erreicht, beträgt aber nur etwa 15% der mit Spermidin erreichten Werte (Diaminopropankonzentration in vivo: 7.0 mM).

Enzymextrakte aus Zellen des Preaggregationsstadiums besitzen die gleiche Polyaminabhängigkeit wie die Extrakte aus vegetativen Zellen.

Pegg (1971) zeigte für Enzymextrakte aus Rattenleber und E. coli K12 tRNA als Substrat optimale Aktivierung der Methylierungsreaktion durch 5 mM Spermidin, 20 mM Putrescin und 20 mM Diaminopropan.

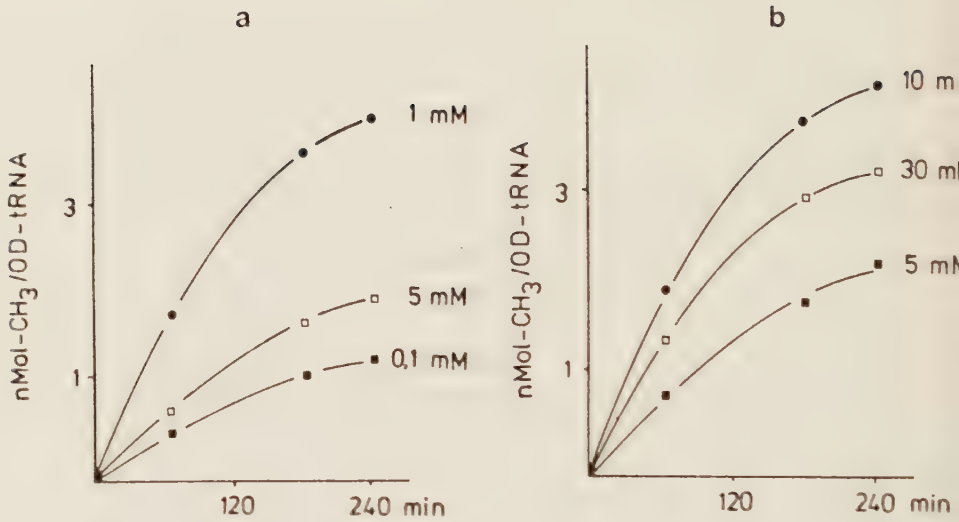


Abb. 4.24.

Methylierung von tRNA bei verschiedenen Polyaminkonzentrationen.

Je 0.1 A₂₆₀ Gesamt-tRNA aus *E. coli* IB-5 wurde bei verschiedenen Polyaminmengen mit einem Enzymextrakt aus vegetativen Zellen von *Dictyostelium* im Standardansatz methyliert. a) Spermidin b) Putrescin.

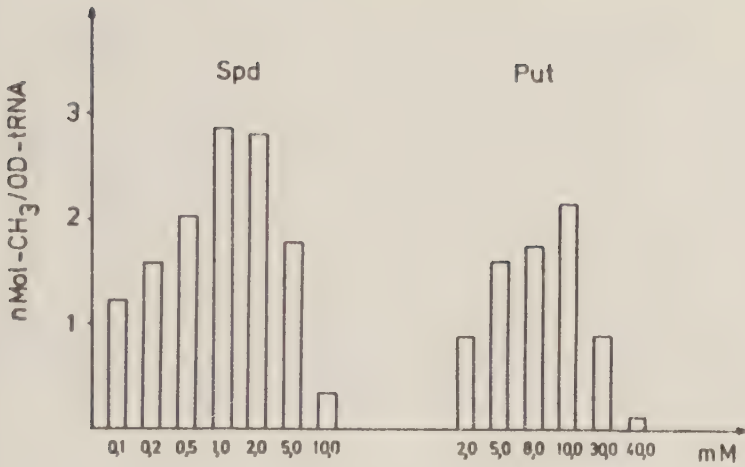


Abb. 4.25.

Polyaminabhängigkeit der Methylierung von *E. coli* Gesamt-tRNA mit einem Enzymextrakt aus der vegetativen Wachstumsphase von *Dictyostelium disc.*

Je 0.1 A₂₆₀ tRNA wurden 4 Stunden im Standardansatz (3.7.) methyliert. Die pH-Werte in den Ansätzen wurden überprüft. Durch den Zusatz der Polyamine trat keine Verschiebung ein.

Bei den einzelnen Enzympräparationen aus *Dictyostelium* disc. variierte das Ausmaß der Inkorporation von Methylgruppen in die tRNA von ca. 2000 pmol Methylgruppen/A₂₆₀ tRNA bis ca. 5000 pmol Methylgruppen/A₂₆₀ tRNA nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei einer Spermidinkonzentration von 2 mM. Da die Haltbarkeit von eukaryontischen tRNA-Methyltransferasen sehr kurz ist, war es nicht möglich, größere Mengen Enzymextrakt zu präparieren und alle Versuche mit der gleichen Präparation durchzuführen. Durch Produktanalyse der tRNA nach Methylierung wurde sichergestellt, daß die unterschiedlichen Aktivitäten nicht auf Verlust einzelner spezifischer Methyltransferasen zurückzuführen sind (Tab. 4.7.).

Die Hemmung der Methylierung von tRNA durch Polyamine beruht nicht auf einer Präzipitation von tRNA bei höheren Polyaminkonzentrationen. Der Reaktionsansatz zeigte keinen Verlust an optischem Material nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 10 000 x g.

Die Möglichkeit einer Degradation der Polyamine, die zu Produkten führen könnte, die die Methylierung hemmen, wurde durch Polyaminanalysen ausgeschlossen. In zwei Ansätzen mit 10 mM Spermidin bzw. 15 mM Putrescin wurden nach 4 Stunden Inkubationszeit im Standardansatz 9.83 mM bzw. 14.95 mM ermittelt.

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, daß Polyamine die Ausbildung der nativen Tertiärstruktur der tRNA im Kristall und in Lösung stabilisieren (Kim 1973, Bolton und Kearns 1977). Voraussetzung scheint eine asymmetrische Triamin-einheit, wie im Fall von Spermidin und Spermin zu sein, da für die symmetrischen Diamine Putrescin und Cadaverin kein Effekt auf die Tertiärstruktur beobachtet werden konnte. Bindungsstudien von Spermidin an tRNA^{Phe} aus Hefe ergaben eine Gesamtzahl von 16 ± 1 Spermidinmoleküle die an ein Molekül tRNA gebunden werden können, wobei 2 Moleküle

Extrakt	I		II	
	cpm	%	cpm	%
m^2_2G	4746	54.3	2964	56.6
m^1G+m^2G	1748	20.0	1007	19.2
T	218	2.5	114	2.2
C_m	270	3.1	93	1.8
m^5C+m^7G	804	9.2	404	7.7
m^1A	961	11.0	659	12.6
total	8747	100.1	5241	100.0

Tab. 4.7.

Produkte der tRNA-Methylierung mit Enzympräparationen aus vegetativen Zellen.

Je 0.2 A₂₆₀ Gesamt-tRNA aus E. coli IB-5 wurden 4 Stunden bei 37°C methyliert. Spez. Aktivität des SAMs: 29 mCi/mmol; 2 mM Spermidin im Ansatz. Die tRNA wurde nach 3.7. reisoliert, zu Nukleotiden abgebaut und zweidimensional nach RhajBhandary (1979) getrennt.

fester gebunden werden (Schreier und Schimmel 1975). Diese beiden Moleküle wurden 1978 von Quigley et al. im Kristall lokalisiert (siehe Abb. 2.1.).

Bei einer Spermidinkonzentration von 2 mM im Methylierungsansatz liegt ein Verhältnis von Spermidin : tRNA von 1500 : 1 vor. Die Polyamine dürften also in jedem Fall im Überschuß gegenüber der tRNA sein, falls nicht der größte Teil an die Proteine des Enzymextraktes assoziiert wird.

Durch eine Gleichgewichtsdialyse wurde die freie Menge an Spermidin im Methylierungsansatz bestimmt.

Abb. 4.26. zeigt die Adsorption von Spermidin an die Proteine des Zellextraktes in Abhängigkeit von der Spermidinmenge im Ansatz. Bei einer Konzentration von 0.2mM Spermidin im Ansatz werden von 100 ug Enzymextrakt 4 nmol Spermidin gebunden, 6 nmol finden sich frei in Lösung. Im Standardansatz der Methylierung finden sich in 50 ul nur 62.5 ug Enzymextrakt (Ansatzvolumen: 160 ul, Enzymmenge 200 ug). Unter der Voraussetzung, daß die Assoziation des Polyamins an das Protein einem Gleichgewicht unterliegt, ist die Konzentration an freiem Spermidin im Methylierungsansatz 15×10^{-5} M. Die Dissoziationskonstante für die beiden fest gebundenen Spermidinmoleküle an die tRNA beträgt 1.5×10^{-5} M (Sakai und Cohen 1976). Die freie Polyaminkonzentration im Methylierungsansatz mit 0.2 mM Spermidin liegt demnach 150 fach über der tRNA-Menge und 10fach über K_{diss} . Für die beiden strukturbestimmenden Spermidinmoleküle dürfte damit in jedem Fall eine Sättigung der tRNA gegeben sein.

Da sich die Polyaminmuster von Dictyostelium und B. subtilis deutlich unterscheiden, wurde auch an B. subtilis untersucht, ob ein Zusammenhang besteht, zwischen den physiologischen Polyaminkonzentrationen und der Aktivierung einer spezifischen tRNA-Methyltransferase durch Polyamine in vitro.

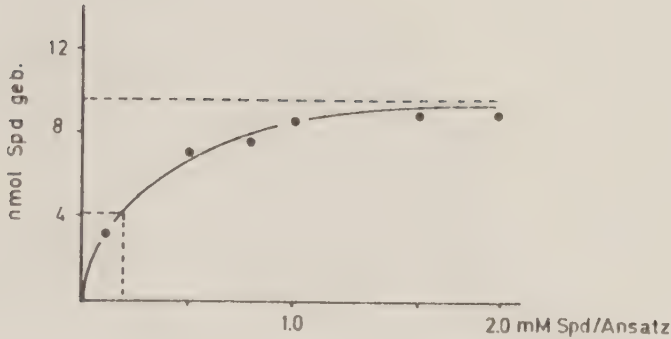


Abb. 4.26.

Adsorption von Spermidin an einen Enzymextrakt aus vegetativen Dictyostelium Zellen.

Benutzt wurden Mikrodialysekammern von etwa 60 ul Fassungsvermögen. Die Kammern wurden durch eine Dialysemembran getrennt. Eingebracht wurden in beide Kammern je 50 ul identische Lösungen, bestehend aus TMG-Puffer (3.7.), 23 pmol ^3H -Spermidin (43 Ci/mmol), Spermidinkonzentrationen von 0.1 - 5.0 mM. Eine der beiden Kammern enthielt in den 50 ul zusätzlich Enzymextrakt entsprechend 100 ug Protein. Die Dialyse wurde 16 Stunden bei 4°C unter langsamer Bewegung der Dialysekammern durchgeführt. Danach wurden jeder Kammer 10 ul entnommen und die Radioaktivität bestimmt.

In *B. subtilis* kommt eine Methylase vor, die ein Adenosin in Position 22 der tRNA zu 1-Methyl-Adenosin methyliert. Diese Modifikation ist spezifisch für einige grampositive Organismen. Da in gramnegativen Bakterien und in Eukaryonten diese Modifikation nicht vorkommt, dienen verschiedene tRNAs aus *E. coli* als geeignete Substrate für das Enzym. Als einziges Produkt wird m¹A in Position 22 in den spezifischen tRNAs für Leucin, Serin, Tyrosin und Glutaminsäure gebildet (Kersten et al. 1978).

Die Polyaminabhängigkeit dieser tRNA-Methyltransferase-Reaktion in vitro ergab ein Optimum bei einer Konzentration von 0.1 mM Spermidin (Abb. 4.27.). Putrescin stimuliert die Reaktion kaum. Die Polyaminbestimmungen haben ergeben, daß *Bacillus subtilis* nur Spermidin enthält (siehe 4.2.1.). Die Konzentration beträgt etwa 1/5 der in *Dictyostelium* ermittelten Werte (bezogen auf Protein). Für eine optimale Methylierung in vitro werden nur 10% der für *Dictyostelium* optimalen Polyaminmengen benötigt. Damit scheint auch bei *B. subtilis* die physiologische Polyaminkonzentration in engem Zusammenhang zu stehen mit einer optimalen Methylierung der tRNA in der Zelle.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Polyaminabhängigkeit der tRNA-Methylierung in vitro auf einer Wirkung der Polyamine am Enzym beruht, und nicht an der tRNA. Die Stabilisierung der Tertiärstruktur der tRNA durch Polyamine ist eine konstante Größe, die durch die Sättigung in allen Ansätzen in gleichem Maße gegeben ist. Für verschiedene Methylasen gibt es jedoch verschiedene Optima der Aktivierung. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen von Leboy (1976), die für eine Guaninmethyltransferase aus Rattenleber bei der Methylierung einer Methioninspezifischen tRNA aus *E. coli* ein Optimum von 0.2 - 0.5 mM Spermidin festgestellt hat, für eine Adenosinmethylase und der gleichen tRNA als Substrat aber eine optimale Konzentration von 2 - 4 mM Spermidin.

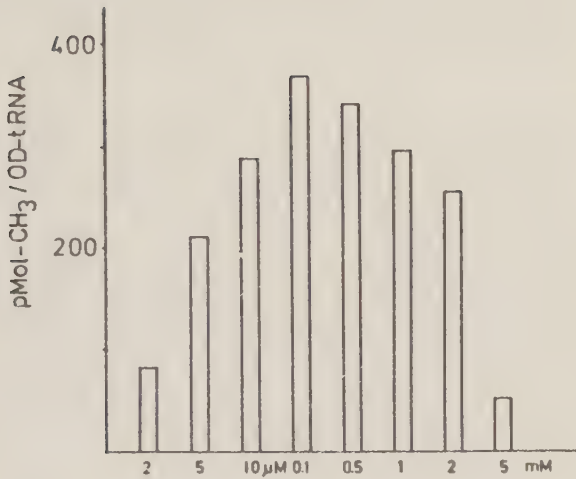


Abb. 4.27.

Polyaminabhängigkeit der Methylierung von *E. coli* MRE 600 Gesamt-tRNA mit einem S_{100} aus *B. subtilis* (m^1A Methylase).

Je 0.5 A_{260} tRNA wurden im Standardansatz 2 Stunden methyliert. Als Enzym wurden 200 μ g eines S_{100} aus *B. subtilis* verwendet, der vor dem Gebrauch 3 x gegen 200 Volumen Puffer (0.02 M Tris/HCl pH 7.5, 10^{-4} M β -ME, 10% Glycerin) dialysiert wurde. Die Methylgruppeninkorporation ohne Polyaminzusatz entsprach dem Leerwert.

4.5.1. Methylierung spezifischer Nukleoside mit Enzymextrakten aus vegetativer Wachstumsphase und Entwicklung.

Da die Bestimmung der Aktivität spezifischer tRNA Methyltransferasen aus *Dictyostelium* bisher nicht möglich ist, wurde durch Analyse der Methylierungsprodukte in der Gesamt-tRNA untersucht, ob spezifische Methylasen durch Polyamine unterschiedlich stimuliert oder gehemmt werden. Für die Analysen wurden je 0.2 A₂₆₀ tRNA mit einem SAM höherer spezifischer Aktivität 4 Stunden methyliert. Die Nukleotidanalysen wurden nach dem Verfahren von RhayBhandarj durchgeführt. Es wurde je ein Enzymextrakt aus der vegetativen Wachstumsphase und der Entwicklung (8 Stunden Phosphatpuffer) eingesetzt.

Folgende Aussagen lassen sich treffen (Tab. 4.8.):

- i) Die Aktivitäten einiger Methylasen unterscheiden sich in den Enzymextrakten aus den verschiedenen Lebensphasen deutlich (Methylasen für m¹A, m⁵C+m⁷G, m¹G+m²G).
- ii) Die eingesetzten Putrescin- und Spermidinkonzentrationen beeinflussen die Menge der gebildeten spezifischen Nukleoside verschieden. Dies betrifft hauptsächlich die Guanosinmethylasen.

Die beobachteten Polyaminabhängigkeiten der Methylierung von tRNA beruhen demnach nicht auf einer Zu- oder Abnahme der gesamten Methyltransferasekapazität. Polyamine beeinflussen spezifisch Enzymaktivitäten.

Eine Veränderung des Polyamingehaltes in der Zelle könnte also zu einer Veränderung des Methylierungsmusters der tRNA führen.

Konz. (mM)	S ₃₀ Vegetativ			S ₃₀ Entwicklung		
	Spermidin	Putrescin		Spermidin	Putrescin	
m ₂ G	2.0	10.0	40.0	2.0	10.0	40.0
m ₂ G	56.6	57.9	41.8	91.9	81.2	77.8
m ¹ G+m ² G	18.3	14.5	25.0	3.1	12.1	12.6
T	1.6	2.6	5.2	1.3	-	1.1
C _m	2.6	2.5	3.0	0.8	-	1.7
m ⁵ C+m ⁷ G	7.6	8.3	14.6	2.0	2.2	3.0
m ¹ A	13.1	14.0	10.3	0.6	4.5	3.5

Tab. 4.8.

Prozentuale Verteilung der in vitro gebildeten Nukleoside in Gesamt-tRNA aus E. coli IB-5
Einfluß verschiedener Polyaminkonzentrationen.

Versuchsdurchführung siehe Legende zu Tab. 4.7.

4.6. Einfluß von Polyaminen auf die tRNA-Methyltransferasen in *Dictyostelium* disc. in vivo.

4.6.1. Hemmung der Synthese von Putrescin, Spermidin und 1,3 Diaminopropan.

Die physiologische Bedeutung der Polyamine kann in Eukaryonten durch eine selektive Hemmung ihrer Synthese untersucht werden. Die Syntheseraten werden durch die Enzyme Ornithindecaboxylase (ODC) und S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC) kontrolliert. Die meisten der bisher gefundenen Inhibitoren wirken an diesen Enzymen. (zusammenfassend beschrieben bei Jänne et al. 1978).

1976 beschrieben Mamont et al. die Hemmung der ODC in Rattenhepatomzellen durch den kompetitiven Hemmstoff α -Methyl-Ornithin (MeOrn). Die Zugabe von α -Methyl-Ornithin zu den Zellkulturen verhindert den Anstieg der Putrescinkonzentration, der beobachtet wird, wenn ungehemmte Zellen durch Verdünnen mit frischem Medium in die Wachstumsphase übergehen. Die Synthese von Spermidin wird ebenfalls gehemmt. Ein Nachteil bei der Verwendung von Strukturanalogen des Ornithin als Hemmstoffe liegt in ihrer Eigenart, die Halbwertszeit der ODC in vivo zu verlängern (McCann 1977). Da die Inhibitoren nicht irreversibel an das Enzym gebunden werden, kommt es zu einer Anhäufung des Enzyms in der Zelle, die den Hemmeffekt teilweise aufhebt.

Eine Verringerung der Enzymmenge in der Zelle kann durch verschiedene Diamine erreicht werden. Pett und Ginsberg (1968) fanden, daß die Synthese der ODC durch erhöhte Putrescinkonzentrationen vermindert wird. Aktiver als die natürlich vorkommenden Diamine sind ihre "unphysiologischen" Homologen. So verhindern 1,3 Diaminopropan oder Cadaverin die Stimulierung der ODC in hepatektomierten Ratten (Pösö et al. 1976).

Ein Nachteil der Diamine ist ihre Fähigkeit, einige Funktionen der natürlich vorkommenden Polyamine in der Zelle zu übernehmen. Alhonen hat dies für Diaminopropan an Ehrlich Ascites Zellen gezeigt. Ein Alkoholderivat - 1,3 Diaminopropan-(2)-ol besitzt diese Fähigkeit nicht (Alhonen 1979).

Da Diaminopropan in Dictyostelium vorkommt, wurde Diaminopropanol als Hemmstoff eingesetzt. α -Methyl-Ornithin, der zweite verwendete Hemmstoff, wurde uns freundlicherweise von Dr. N. Seiler, Straßbourg, zur Verfügung gestellt.

4.6.2. Hemmung der Polyaminsynthese durch α -Methyl-Ornithin.

Eine geeignete Konzentration von α -Methyl-Ornithin (MeOrn) für die Hemmung der Polyaminsynthese in Dictyostelium wurde durch Inkubation von vegetativ wachsenden Zellen mit Konzentrationen von 2 - 10 mM MeOrn im Ansatz ermittelt. Die Proteinsynthese der Zellen wurde durch gleichzeitige Zugabe von 50 uCi eines ^3H -Aminosäuregemisches während einer Generation verfolgt.

Bei einer Konzentration von 10 mM MeOrn tritt eine deutliche Hemmung der Proteinsynthese ein (Abb. 4.28.). Da das Zellwachstum möglichst unbeeinflusst bleiben sollte, wurden die Polyaminspiegel in den Ansätzen mit 2 mM und 5 mM gemessen.

Im Ansatz mit 5 mM MeOrn wird die Synthese von Diaminopropan und Putrescin vollständig gehemmt. Die Hemmung setzt etwa 4 Stunden nach der Zugabe ein (Abb. 4.29.). Die Spermidinkonzentrationen in den mit Hemmstoff behandelten Zellen liegen während des gemessenen Zeitraumes über den Spermidinwerten der Kontrolle.

Der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA ist während der ersten 8 Stunden nach Zugabe von MeOrn identisch mit der Kontrolle (Abb. 4.30.).

Bei Konzentrationen von 2 mM MeOrn im Medium wird die Polyaminsynthese nicht gehemmt.

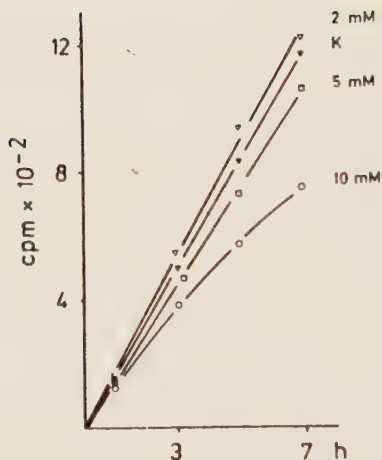


Abb. 4.28.

Proteinsynthese von vegetativ wachsenden *Dictyostelium* Zellen unter dem Einfluß von α -Methyl-Ornithin.

2 ml Kulturen wurden bei einer Zellzahl von 2.4×10^6 Zellen/ml mit verschiedenen Konzentrationen an α -Methyl-Ornithin inkubiert. Die Netto-Proteinsynthese wurde durch gleichzeitige Zugabe von 50 uCi eines ^3H -Aminosäuregemisches (1 mCi/ml) verfolgt. Zu den angegebenen Zeiten wurden von den Kulturen jeweils 50 μl auf Papierfilter entnommen, kurz unter dem Pöf angetrocknet und die Proteine mit TCA (10% 1 Stunde bei 4°C gefällt. Die Filter wurden je 3 x mit TCA (5%), Äthanol und Äther gewaschen und die Radioaktivität bestimmt.

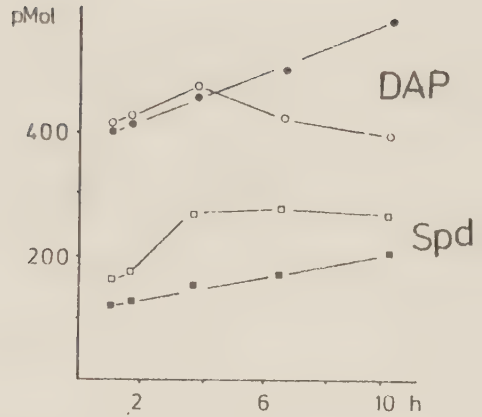
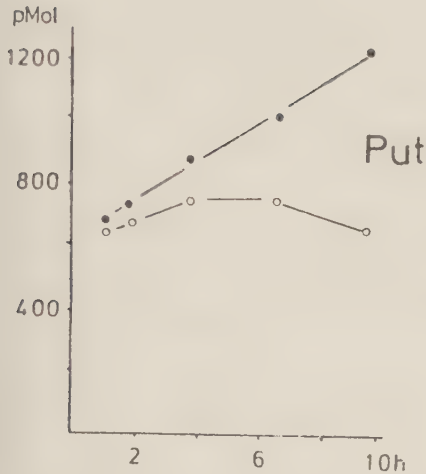


Abb. 4.29.

Polyaminsynthese in *Dictyostelium* unter dem Einfluß von α -Methyl-Ornithin.

Zu den angegebenen Zeiten wurden einer vegetativ wachsenden Kultur je 10 ml entnommen (Anfangszellzahl: 1×10^6 Zellen/ml). Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit 10 ml Phosphatpuffer (3.2.1.) gewaschen und die Polyamine 2 x mit je 500 μ l TCA (10%) bei 4° C extrahiert. 10 μ l des Extraktes wurden für die Analysen verwendet.

● - ● Kontrolle, o - o Kultur mit 5 mM MeOrn.

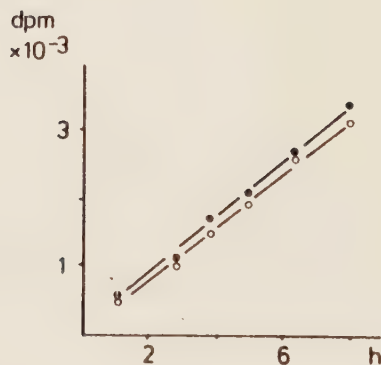


Abb. 4.30.

DNA-Synthese von vegetativ wachsenden Dictyostelium Zellen unter dem Einfluß von α -Methyl-Ornithin.

Eine 2 ml Kultur wurde gleichzeitig mit 10 μ mol MeOrn und 50 μ Ci 3 H-Thymidin (18.7 Ci/mmol) versetzt. Jeweils 80 μ l wurden auf Filterplättchen pipettiert, Aufarbeitung der Proben siehe Legende Abb. 4.28.

● - ● Kontrolle, o - o Ansatz mit MeOrn.

4.6.3. Hemmung der Polyaminsynthese durch 1,3 Diaminopropan-(2)-ol.

Die geeignete Hemmkonzentration für Diaminopropanol wurde wie in 4.6.2. ermittelt.

Die Synthese aller Polyamine wird durch Diaminopropanol mit einer Konzentration von 5 mM im Medium völlig verhindert. Die Hemmung setzt kurze Zeit nach der Zugabe ein (Abb. 4.31.).

Der Einbau von Thymidin in die DNA wird durch Diaminopropanol ebenfalls gehemmt. Der Endwert nach 8 Stunden Inkubation, bei gleichzeitiger Zugabe von Thymidin und Diaminopropanol, entspricht 73% der Kontrolle (Abb. 4.32.).

4.6.4. Synthese und Methylierung von Gesamt-RNA unter Polyaminmangel.

Ob eine veränderte Polyaminkonzentration in vegetativ wachsenden Dictyostelium Zellen Einfluß auf die Methylierung von Gesamt-RNA hat, wurde mit folgenden Experimenten untersucht:

Vegetativ wachsende Zellen wurden für 8 Stunden mit 1,3 Diaminopropanol bzw. α -Methyl-Ornithin inkubiert (Konzentration im Medium: 5 mM). Die Nettosynthese und Methylierung der RNA wurde durch Doppelmarkierung mit ^3H -Uridin und Methyl- ^3H -Methionin ermittelt. Markiert wurde von 0 - 4 und 4 - 8 Stunden nach Hemmstoffzugabe.

α -Methyl-Ornithin hat während der ersten 4 Stunden nach der Zugabe keinen Einfluß auf die RNA Synthese und die Methylierung der RNA (Abb. 4.33. A/B). Im Zeitraum von 4 - 8 Stunden wird die Synthese und Methylierung der RNA gehemmt. Die Endwerte nach 8 Stunden liegen im Einbau von Uridin bei 76% der Kontrolle, im Einbau von Methionin bei 58% (Abb. 4.33. C/D).

Diaminopropanol hemmt die Methylierung der RNA in beiden Markierungsintervallen. Nach 8 Stunden ist der Einbau

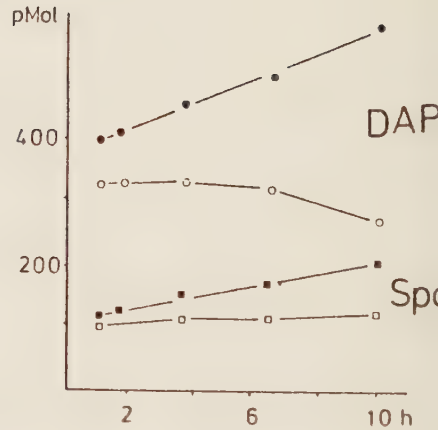
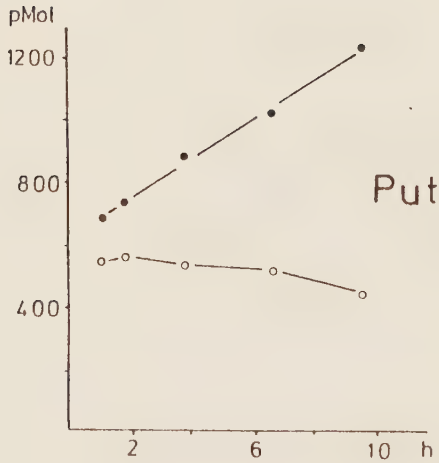


Abb. 4.31.

Polyaminsynthese in Dictyostelium unter dem Einfluß von 1,3 Diaminopropan(2)ol.

Ermittlung der Analysenwerte siehe Legende zu Abb. 4.29.

● - ● Kontrolle, o - o Kultur mit 5 mM DAP-OH.

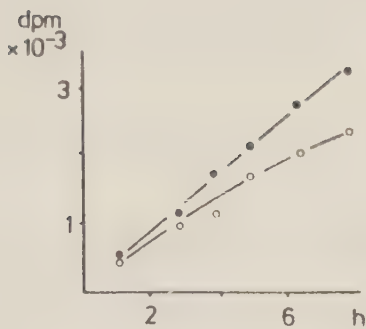


Abb. 4.32.

DNA Synthese unter dem Einfluß von 1,3 Diaminopropan(2)ol.

Ermittlung der Werte wie in Legende zu Abb. 4.30. beschrieben.

von Uridin - ähnlich dem Ansatz mit α -Methyl-Ornithin - auf 70% der Kontrolle gesunken (C). Der Einbau von Methionin beträgt zum gleichen Zeitpunkt noch 36% der Kontrolle (D).

4.6.5. Synthese und Methylierung von Gesamt-tRNA unter Polyaminmangel.

Das geringere Ausmaß der Methylierung der Gesamt-RNA kann zwei Gründe haben:

i) Unter Polyaminmangel werden untermethylierte tRNAs gebildet.

ii) Die Synthese der tRNAs ist gehemmt.

Da die tRNA nur etwa 15% der Gesamt-RNA ausmacht, aber 80 - 90% der in RNA vorkommenden Modifikationen trägt, würden beide Ursachen zu dem gezeigten Ergebnis führen. Daher wurde in den folgenden Experimenten die tRNA isoliert und eindimensional elektrophoretisch gereinigt.

Die Synthese und Methylierung der tRNA wurde durch Markierung mit ^3H -Uridin bzw. Methyl- ^3H -Methionin gemessen. (Tab. 4.10).

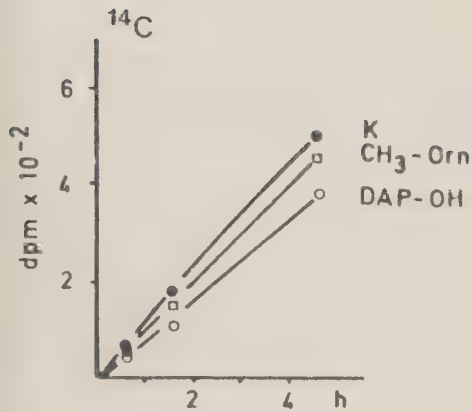
Die eingebaute Radioaktivität in Ansatz 1 und 2 zeigt, daß die Nettosynthese von tRNA durch Diaminopropanol nicht betroffen ist. Der Einbau von Methionin in die tRNA beträgt im gehemmten Ansatz noch 51% der Kontrolle. Dies entspricht den mit Gesamt-RNA ermittelten Werten.

4.6.6. Methylierung spezifischer Nukleoside der tRNA unter Polyaminmangel.

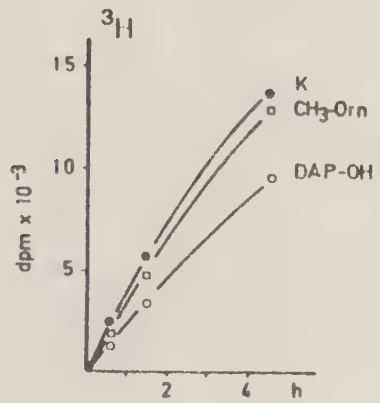
Mit den bis zu diesem Zeitpunkt in unserem Labor verwendeten Methoden war es nicht möglich, die Synthese von methylierten Nukleosiden der tRNA in der vegetativen Wachstumsphase von Dictyostelium zu bestimmen. Das Medium, in dem Dictyostelium gezüchtet wird, ist etwa 2 mM an Methionin (Franke und Kessin 1977). Die eingesetzte spezifische Radioaktivität des Methionins wird dadurch so weit verdünnt, daß keine genügend hohe Markierung der tRNA zu erreichen

Abb. 4.33.

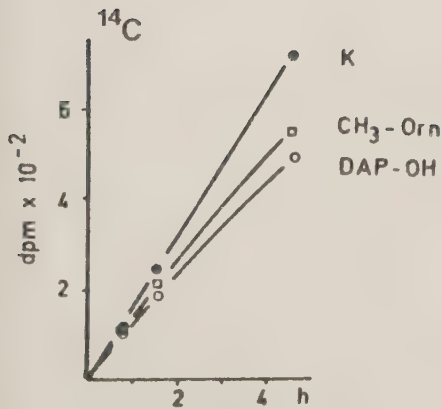
Synthese und Methylierung von RNA in Dictyostelium unter dem Einfluß von α -Methyl-Ornithin und 1,3 Diaminopropan(2)ol.



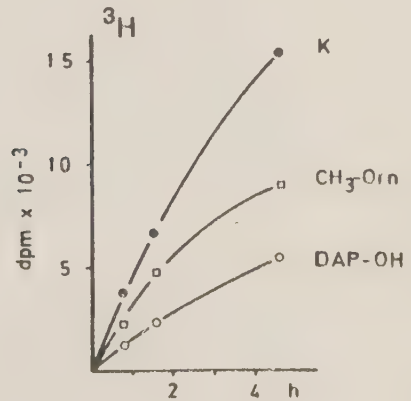
A



B



C



D

Legende Abb. 4.33.

Bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml wurden den Kulturen (je 5 ml) die Hemmstoffe zugegeben. Die Markierung der Zellen erfolgte gleichzeitig (A,B) bzw. 4 Stunden nach Hemmstoffzugabe (C,D). Markiert wurde mit 100 uCi Methyl- ^3H -Methionin (12 Ci/mmol) und 20 uCi ^{14}C -Uridin (58 mCi/mmol). Zur Bestimmung von Polyaminen, RNA und Protein siehe 3.10. Die Polyaminspiegel entsprachen den in 4.29. und 4.31. gezeigten Verläufen.

Ansatz:	A ₂₆₀ /Ansatz	cpm/A ₂₆₀
1) ³ H-Uridin	0.24	1.2 x 10 ⁵
2) ³ H-Uridin, DAP-OH	0.28	1.3 x 10 ⁵
3) ³ H-Methionin	0.31	4.5 x 10 ⁴
4) ³ H-Methionin, DAP-OH	0.25	2.7 x 10 ⁴

Tab. 4.10

Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit 5 ml Phosphatpuffer (3.2.1.) gewaschen und in 500 μ l TMS-Puffer (3.3.) suspendiert. Nach der Zugabe von 500 μ l TMS (1% SDS) wurde 30 sec. auf dem Whirlmix geschüttelt. Danach wurde 1 ml Phenol/TMS (80% Phenol, 20% TMS (w/w)) zugegeben und 30 min. bei 4°C gerührt. Nach der Trennung der Phasen durch Zentrifugation wurde die Phenolphase noch einmal mit 1 ml TMS-Puffer extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und die Nukleinsäuren mit 2.5 Vol. Äthanol abs. über Nacht bei -20°C gefällt. Die tRNAs wurden durch eine eindimensionale Gelelektrophorese von den übrigen Nukleinsäuren abgetrennt (10%iges Polyacrylamidgel, Geldicke 1 mm, Laufstrecke 20 cm). Die tRNA-haltigen Banden wurden ausgeschnitten und elektrophoretisch eluiert. Nach dem erneuten Fällern bei -20°C wurden die tRNAs in 1ml H₂O gelöst und die Konzentration und die Radioaktivität bestimmt.

tRNA zu erreichen ist, um dünnschichtchromatographisch die modifizierten Basen bestimmen zu können.

1979 wurde von Davis et al. ein neues Verfahren zur Bestimmung von Nukleosiden beschrieben. Verwendet wird eine HPLC-Anlage mit zwei RP-18 Säulen. Die Methode ist äußerst sensibel. Mengen von 0.1 nmol/Nukleosid können optisch noch exakt quantitativ erfaßt werden. Der große Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, durch Fraktionierung des Säuleneluats und Bestimmung der Radioaktivität im Dioxanzsintillator noch Mengen erfassen zu können, die durch Fluorographie von Dünnschichtplatten nicht mehr bestimmt werden können. Die Methode wurde von mir in Zusammenarbeit mit M. Nowak in unserem Labor aufgebaut.

Bestimmt wurden die methylierten Nukleoside von Methyl-³H-Methionin markierten tRNAs aus unbehandelten und mit Diaminopropanol bzw. α -Methyl-Ornithin behandelten Zellen. (Markierung der tRNA und Hemmung der Polyaminsynthese siehe 4.6.4).

Die Hemmung der Polyaminsynthese beeinflusst die Methylierung der Nukleoside von Gesamt-tRNA unterschiedlich. Die prozentuale Untermethylierung der einzelnen Nukleoside beträgt 20 - 40%. Von den identifizierten Nukleosiden ist Ribothymidin durch beide Hemmstoffe mit einer Hemmung von 40% gegenüber der Kontrolle am stärksten betroffen. (Tab. 4.11.)

Die Synthese von zwei Nukleosiden zeigt eine absolute Abhängigkeit von der physiologischen Polyaminkonzentration in der Zelle (bezeichnet als N_1 und N_2). Die Retentionszeiten dieser Nukleoside fallen exakt zusammen mit denen für die Hauptbasen Guanosin (N_1) und Adenosin (N_2) (Abb. 4.34.).

4.6.7. Charakterisierung von 2 unbekannten markierbaren Nukleosiden (N_1 und N_2).

Für die beiden unbekannten Nukleoside ergab sich die Frage, ob es sich um Guanosin und Adenosin handelt, oder ob die Methylgruppen in zwei unbekannte Nukleoside eingebaut

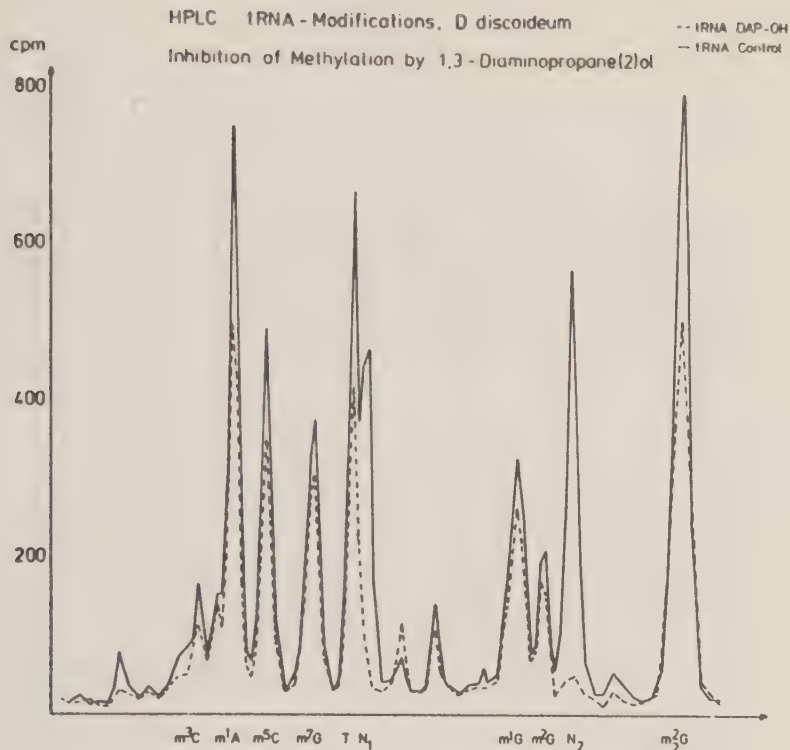


Abb. 4.34.

Hemmung der Methylierung von tRNA unter dem Einfluß von
1,3 Diaminopropan-(2)-ol.

10 ml vegetativ wachsende Dictyostelium Zellen wurden bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml mit DAP-OH versetzt (Konzentration im Ansatz: 5 mM). Ein identischer Kontrollansatz blieb unbehandelt. Nach 4 h wurde beiden Kulturen je 1 mCi Methyl- ^3H -Methionin (12 Ci/mmol) zugegeben und nach weiteren 4 h die tRNA isoliert, eindimensional elektrophoretisch gereinigt und zu Nukleosiden verdaut (3.8.). Für die HPLC-Analysen wurden je 0.3 A_{260} tRNA mit 5.8×10^4 cpm bzw. 3.8×10^4 cpm verwendet. Das Säuleneluat wurde in 30 sec. Fraktionen gesammelt und die gesamte Fraktion (500 ul) in Dioxanszintillator gezählt. Die Elutionsprofile der tRNAs aus den beiden Hemmversuchen waren identisch.

Nukleosid	% der Kontrolle	
	DAP-OH	MeOrn
m ¹ A	71.4	83.1
m ⁵ C	71.3	69.0
m ⁷ G	78.4	77.1
T	60.6	64.1
m ¹ G	84.7	95.8
m ² G	78.3	71.8
m ₂ ² G	66.3	64.1

Tab. 4.11.

Hemmung der Methylierung spezifischer Nukleoside unter dem Einfluß von Diaminopropanol und α -Methyl-Ornithin.

werden, die durch die HPLC-Analyse nicht von den Purinen getrennt werden können.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren für die Isolierung und die Strukturaufklärung von modifizierten Nukleosiden gehen von etwa 5000 A₂₆₀ Gesamt-tRNA aus. Solche Mengen tRNA aus Dictyostelium zu isolieren, erfordert einen großen Zeit- und Materialaufwand. Daher wurde durch folgende Experimente versucht, N₁ und N₂ näher zu charakterisieren:

A) Markierung der tRNA mit S-Adenosylmethionin (Methyl-³H).

Falls N₁ und N₂ durch Methyl-³H-Adenosylmethionin ebenfalls markierbar sind, kann angenommen werden, daß eine intakte Methylgruppe am Aufbau der Nukleoside beteiligt ist.

Wie Abb. 4.35. zeigt, werden beide Nukleoside durch SAM markiert.

B) Grundgerüst von N₁ und N₂.

Die Art des Grundgerüsts von N₁ und N₂ wurde durch radioaktive Markierung von vegetativ wachsenden Zellen mit den Hauptbasen Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin ermittelt.

Da die Pyrimidine aus der gemeinsamen Vorstufe UMP entstehen, wird bei Zugabe von radioaktiv markiertem Uridin eine gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität in Uridin und Cytosin beobachtet. Die Bildung von CTP aus UTP kann jedoch durch die Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem CTP gehemmt werden. Bei einer CTP-Konzentration von 20 µg/ml Medium wird das Verhältnis der Markierung auf 1 : 0.2 vermindert. Dadurch kann durch die Menge der inkorporierten Radioaktivität festgestellt werden, ob ein Cytidin- oder Uridinderivat vorliegt.

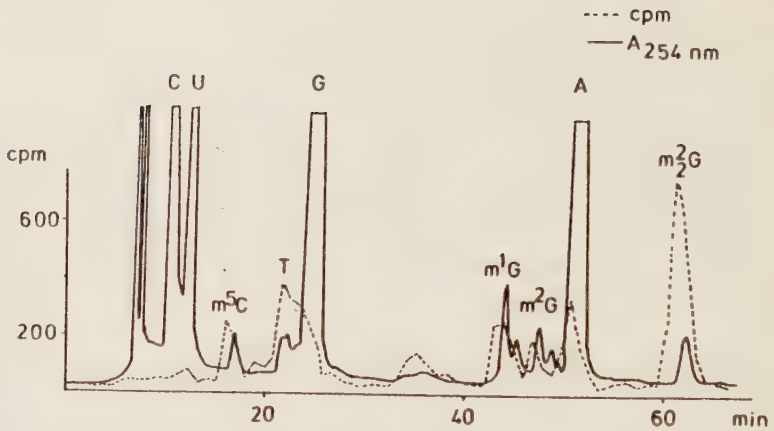


Abb. 4.35.

Nukleosidanalyse einer mit S-Adenosyl-Methionin markierten tRNA.

Eine 10 ml Kultur wurde bei einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml mit 100 μCi ^3H -SAM (12 Ci/mmol) für 8 Stunden markiert.

Analyse der tRNA siehe Legende Abb. 4.34.

Probe: 0.6 A_{260} tRNA mit 1.1×10^4 cpm.

Die weniger gute Auflösung des Radioaktivitätsprofils ist durch die Fraktionsdauer von 1 min. bedingt.

Die Nukleoside N_1 und N_2 sind durch Cytidin markierbar. Die geringere Markierung der Nukleoside durch ^3H -Uridin dürfte auf die Restaktivität des normalen Biosyntheseweges für Cytidin beruhen (Abb. 4.36.).

Im Ansatz mit ^3H -Adenosin findet keine Inkorporation von Radioaktivität in N_1 statt. N_2 kann durch ^3H -Guanosin nicht markiert werden.

C) Trennversuche in verschiedenen Systemen.

Die modifizierten Nukleoside werden bei der HPLC-Analyse mit einem 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ Puffer eluiert. Um das chromatographische Verhalten von N_1 und N_2 in anderen Trennsystemen testen zu können, muß die Probe salzfrei sein. Dies wurde durch die Verwendung eines rückstandslos verdampfbaren Puffersystems bei der HPLC-Analyse erreicht. Ein Ammonium-Formiat/Methanol/Wasser-Gemisch ergab befriedigende Trennungen. N_1 und N_2 eluieren unter diesen Bedingungen ebenfalls mit Guanosin bzw. Adenosin (Abb. 4.37.).

Um mehrere Trennsysteme mit dem gleichen tRNA-Hydrolysat analysieren zu können, wurde eine größere Menge radioaktiv markierter tRNA präpariert. Aus einer 50 ml Kultur, die 24 Stunden mit 3 mCi Methyl- ^3H -Methionin markiert worden war, konnten 2 A_{260} tRNA mit 50 000 cpm isoliert werden. Die tRNA wurde zu Nukleosiden verdaut und in 4 Teilen auf der HPLC-Anlage getrennt. Das Eluat wurde in 1 min. Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen von min. 34 - 39 (1) und 59 - 62 (2) wurden vereinigt und lyophilisiert. Jede Probe enthielt 5000 cpm. In Probe 1 befindet sich außer N_1 Ribothymidin als markiertes Nukleosid.

1) Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von N_1 und N_2 .

In keinem der verwendeten Systeme konnte die Radioaktivität der Probe 2 von Adenosin getrennt werden. In Probe 1 konnte als radioaktiv markierte Substanz ausschließlich Ribothymidin nachgewiesen werden (Abb. 4.38.).

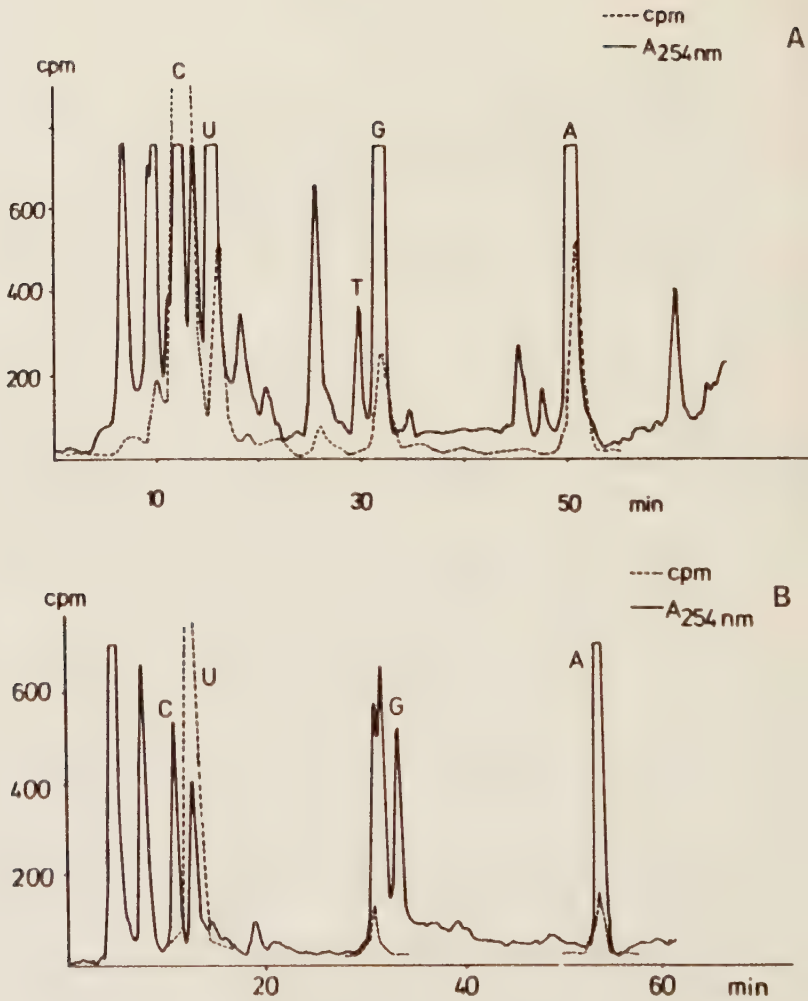


Abb.4.36.

Nukleosidanalyse von 3H -Cytidin und 3H -Uridin markierten tRNA

Je 10 ml Zellen wurden während der vegetativen Wachstumsphase mit A) 1 mCi 3H -Cytidin (4Ci/mmol) und B) 1 mCi 3H -Uridin (25 Ci/mmol) für 12 Stunden markiert.

Analysenmengen: A) 0.43 A_{260} mit 8.5×10^4 cpm

B) 0.29 A_{260} mit 1.4×10^4 cpm

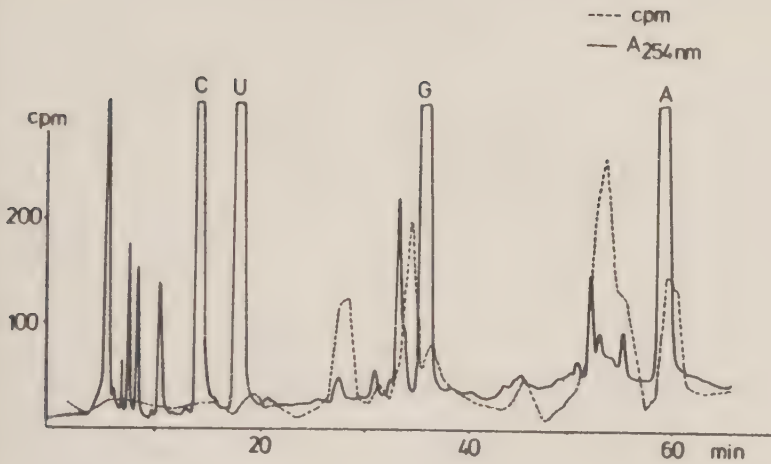


Abb. 4.37.

Nukleosidanalyse mit einem Ammoniumformiat/Methanol Puffersystem.

Analysenmenge: 0.4 A₂₆₀ tRNA.

Puffer A : 1 mM COONH₄ pH 5.3

B : 0.5 mM COONH₄ pH 5.3, 50% Methanol

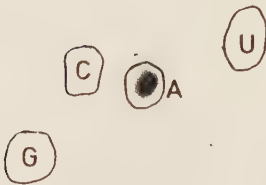
Elutionsprogramm: 0 - 20 min. 100% A; 20.1 - 40 min.

10% B; 40.1 - 60 min. 20% B; 60.1 - 80 min. 60% B.

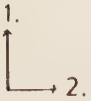
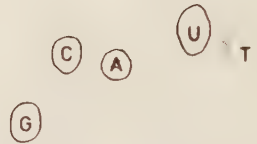
Abb. 4.38.

Dünnschichtchromatographische Trennung von N_1 und N_2 .

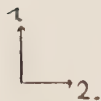
a



b



c



Legende Abb. 4.38.

Dünnschichtchromatographische Trennung von N_1 bzw. N_2

Fließmittel:

a, b

1. Dimension

tert. Butanol / 0.08 M Ameisensäure / Isoamylalkohol
50 / 50 / 2

2. Dimension

Isopropanol / Amoniumazetat 5% pH 3.5
60 / 25

c

1. Dimension

1-Butanol / Isobuttersäure / NH_4OH conc. / H_2O
75 / 37,5 / 2.5 / 25

2. Dimension

Ammoniumsulfat ges. / 0.1 M Na-azetat pH 6.0 / Isopropanol
79 / 19 / 2

Je 20 μl Probe 1 bzw. Probe 2 (= 500 cpm) wurden mit je 0.5 A_{260} Einheiten der Hauptbasen versetzt und getrennt.

ii) Säulenchromatographie von N_1 und N_2 .

1971 hat Leboy ein Verfahren beschrieben, Nukleoside und ihre methylierten Derivate an einem Dowex Kationenaustauscherharz zu trennen. Verwendet wurde der stark saure Austauschharz AG 500 W-X4 minus 400 mesh.

Auch in diesem System ist die Radioaktivität nicht von den Hauptbasen zu trennen. Auf Grund der empfindlicheren Meßmethode durch Zählen des Säuleneluats im Dioxanszintillator konnte nachgewiesen werden, daß Probe 1 aus zwei radioaktiv markierten Substanzen besteht. Die Gipfelfraktionen fallen mit T und G zusammen (Abb. 4.39.).

D) Nukleosidanalysen von Methyl- 3H -Methionin markierter 5S, 16S und 23S RNA.

Bei der gelelektrophoretischen Reinigung der 3H -Methionin markierten tRNAs wurden die Regionen der 5S, 16S und 23S RNA ebenfalls aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Diese Proben wurden zu Nukleosiden verdaut und auf der HPLC-Anlage analysiert.

Die Analysen der 5S RNA ergaben keine eindeutige Aussage. Es wurde zwar Radioaktivität in den beiden Hauptbasen A und G gefunden, jedoch konnten auch die übrigen methylierten Basen nachgewiesen werden.

Die 5S RNA trägt keine Modifikationen. Die methylierten Basen stammen wahrscheinlich aus tRNA Vorläufermolekülen, mit denen die ausgeschnittene Gelregion verunreinigt war. In der 16S und 23S RNA konnte eindeutig eine radioaktive Markierung in Adenosin und Guanodin festgestellt werden (Abb. 4.40.). Das Fehlen der übrigen Modifikationen zeigt, daß diese RNAs nicht mit tRNA oder tRNA-Vorläufern verunreinigt waren.

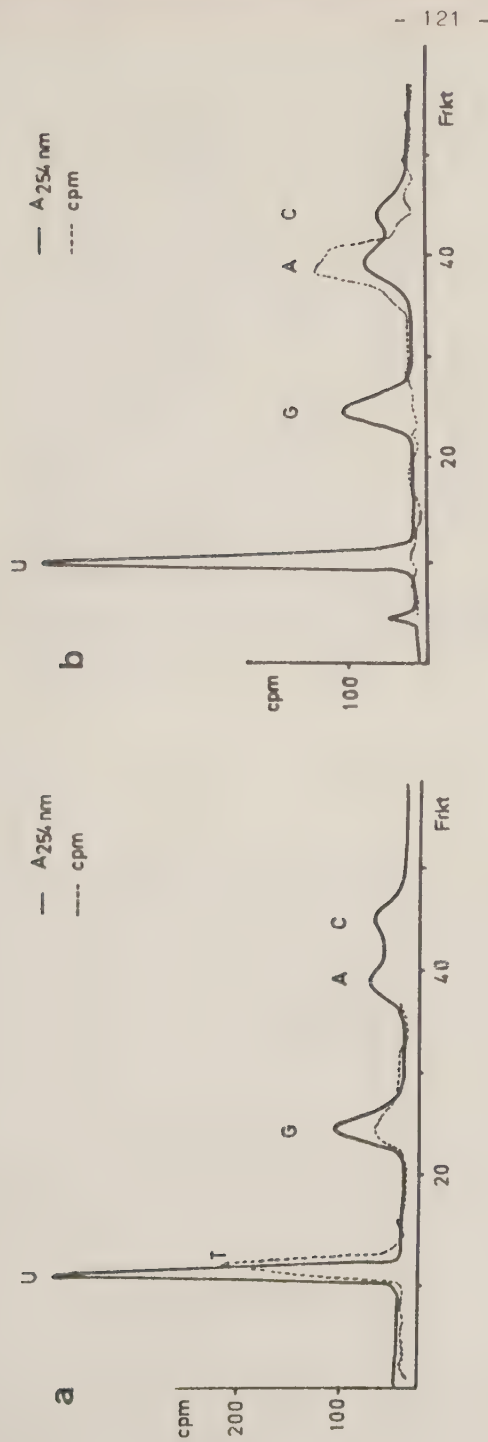


Abb. 4.39.

Säulenchromatographie von N_1 und N_2 an einem Dowex Kationenaustauscher.

Die Proben wurden in 200 μ l 0.4 M Ammoniumformiatpuffer pH 4.65 gelöst und auf eine 1.2 x 25 cm Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit dem gleichen Puffer. Durchfluß: 0.6 ml/min. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. 800 μ l jeder Fraktion wurde im Dioxanzintillator gezählt. a) Je 0.5 A₂₆₀ Hauptbasen + 500 cpm Probe 1 (N_1); b) je 0.5 A₂₆₀ Hauptbasen + 500 cpm Probe 2 (N_2).

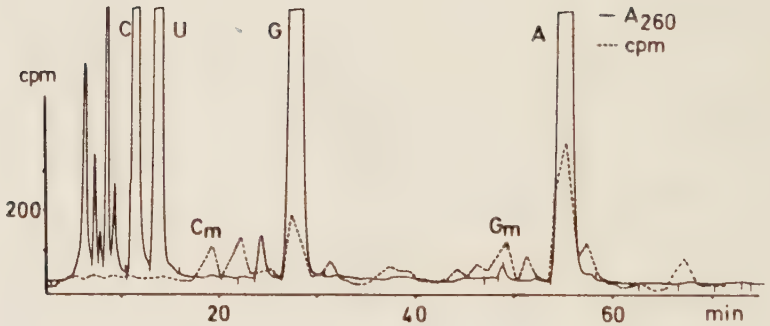


Abb. 4.40.

Nukleosidanalyse von Methyl- ^3H -Methionin markierter 16S und 23S RNA aus *Dictyostlium disc.*

Die 16S und 23S RNA der Markierung 4.3.1. wurden aus dem Gel eluiert, zu Nukleosiden verdaut und auf der HPLC-Anlage getrennt. Analysenmenge: $0.6 A_{260}$ RNA mit 4000 cpm.

4.5.8. Synthese von N_1 und N_2 während der Preaggregationsphase von Dictyostelium.

Die dünnschichtchromatographischen Analysen der mit Methyl- 3H -Methionin markierten tRNA aus dem Preaggregationsstadium von Dictyostelium hatten keine radioaktive Markierung in den Purinen Adenosin und Guanosin ergeben (siehe Abb. 4.21.). Diese Befunde konnten durch HPLC-Analysen von Nukleosiden aus tRNA, 16S und 23S RNA, die im Zeitraum von 4 - 8 Stunden während der Preaggregation markiert worden waren, bestätigt werden. Die physiologische Verminderung der Polyaminkonzentration während der Preaggregationsphase von Dictyostelium hat demnach den gleichen Einfluß auf die Synthese von N_1 und N_2 , wie die Verminderung der Polyaminmenge durch Hemmstoffe der Polyaminsynthese in vegetativ wachsenden Zellen.

4.5.9. Einfluß von 1,3 Diaminopropan(2)ol auf die Sporenbildung von Dictyostelium.

Die Bedeutung des physiologischen Polyaminspiegels für die Differenzierung von Dictyostelium wurde mit Kulturen untersucht, die dem Hemmstoff 1,3 Diaminopropan(2)ol in verschiedenen Zeiträumen ausgesetzt waren:

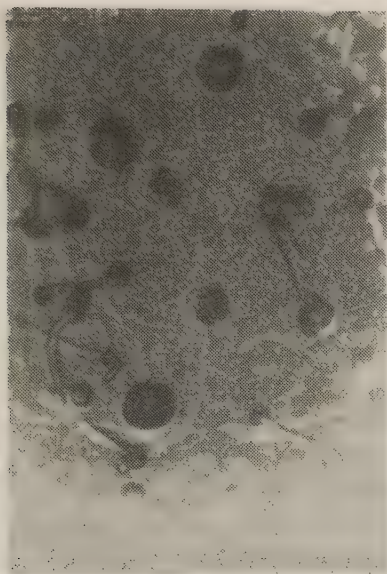
	veg. Phase	Differenzierung
A)	-	-
B)	+	-
C)	-	+
D)	+	+

+ = Zellen unter Diaminopropanoleinfluß

Wie die Abb. 4.41. A - D zeigen, ist eine deutliche Korrelation zwischen dem Zeitraum der Hemmstoffzugabe und der Ausbildung von Sporen festzustellen.

Zellen, die im vegetativen Wachstumsstadium 8 Stunden dem Hemmstoff ausgesetzt waren und ohne Hemmstoff differenzieren konnten, bilden weniger Sporenkörper, die in den meisten Fällen auch kleiner waren als die Sporenkörper der Kontrollzellen (A,B). Wird der Hemmstoff bei Beginn der Differenzierung zugesetzt, fließen die Zellen noch zu größeren Zellverbänden zusammen, bilden aber keine selbstständigen Differenzierungseinheiten mehr (C).

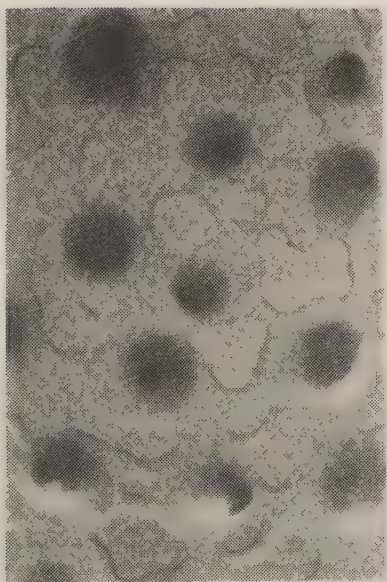
Werden die Zellen in den letzten 8 Stunden des vegetativen Wachstums und während der Differenzierung mit Diaminopropanol behandelt, findet keine Ausbildung von Differenzierungsformen statt.



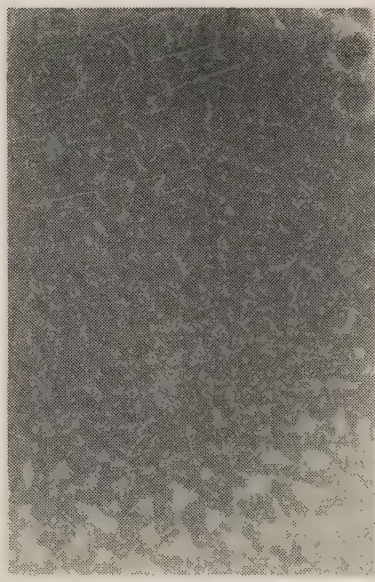
A



B



C



D

Legende zu Abb. 4.41.

Einfluß von 1,3 Diaminopropanol auf die Sporenbildung von Dictyostelium.

Eine 800 ml Kultur wurde bei einer Zellzahl von 2.3×10^6 Zellen/ml mit DAP-OH versetzt (Konzentration im Medium: 5 mM). Eine zweite Kultur blieb unbehandelt. 8 Stunden nach Zugabe von DAP-OH wurden beide Kulturen abzentrifugiert ($3000 \times g$, 3 min.) und die Zellen 2 x mit je 50 ml Phosphatpuffer (3.2.1.) gewaschen. Beim zweiten Waschvorgang wurde jede Kultur in zwei gleiche Teile geteilt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in Phosphatpuffer mit einer Zelldichte von 4×10^8 /ml aufgenommen (Ansatz A und C). Die Teile B und D wurden in Phosphatpuffer, der 5 mM an DAP-OH war, mit der gleichen Zelldichte suspendiert. Von jedem Ansatz wurden 5 Agarplatten angelegt. Auf jede Platte wurden 0.5 ml Zellsuspension ausgestrichen. Die Differenzierung der Ansätze erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Abbildungen wurden nach 30 Stunden Differenzierung aufgenommen.

5. Diskussion

Transfer-Ribonukleinsäuren besitzen als einzige Nukleinsäuren neben den "normalen" Basen einen hohen Anteil an modifizierten Nukleosiden. Ein großer Teil dieser Modifikationen besteht aus Methylierungen der Base oder der Ribose. Die Funktion der methylierten Nukleoside ist in vielen Fällen noch unklar. Diskutiert wird eine regulatorische Rolle bei der Zelldifferenzierung und bei der Wachstumskontrolle. Diese Hypothese stützt sich auf Befunde von Änderungen im Gehalt an methylierten Nukleosiden während der Zelldifferenzierung und der Tumorentstehung (Heady und Kerr 1975, Swiatek et al. 1971, Craddock 1970, Osterman 1979).

Die enzymatische Methylierung von tRNA in vitro wird beeinflusst durch aliphatische Polyamine.

Bei den untersuchten Methylierungssystemen wurde in vitro eine Stimulierung der Methylierung durch Polyamine beobachtet, die durch andere Kationen nicht erreicht werden konnte (Pegg 1971, Leboy 1976).

Die Polyaminkonzentrationen in differenzierenden und neoplastischen Geweben verändern sich ebenfalls (Tabor und Tabor 1976, Jänne et al. 1978).

Es könnte demnach ein kausaler Zusammenhang bestehen zwischen der Veränderung von methylierten Nukleosiden in der tRNA und der Polyaminkonzentration in der Zelle. Die Untersuchung dieser Frage steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Als einfaches differenzierendes System wurde der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* gewählt. Dieser Organismus wächst in einem flüssigen Medium als einzellige Amöbe. Durch Entzug des Nährmediums wird ein Entwicklungszyklus ausgelöst, bei dem Zellaggregate von etwa 10^5 Zellen verschiedene gut definierte Entwicklungsstadien durchlaufen, wobei spezialisierte Zelltypen auftreten. Mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers, der aus Stiel- und Sporen-

zellen besteht, wird die Entwicklung beendet.

In unserem Arbeitskreis wurde gefunden, daß sich der Gehalt an methylierten Nukleosiden während der Entwicklung von *Dictyostelium* ändert (Dingermann, Schmidt, Kersten 1977). Neben geringen Änderungen von 5-Methyl-Cytosin, Pseudo-uridin und Dimethylguanosin wurde eine starke Verminderung des Ribothymidingehaltes festgestellt. Im vegetativen Stadium beträgt der rT-Gehalt von Gesamt-tRNA 0.75 Mol%, nach 16 Stunden Entwicklung in Phosphatpuffer noch 0.45 Mol%.

Es wurde zunächst die Frage untersucht, ob die beobachteten Veränderungen durch tRNAs mit einer geänderten Primärsequenz hervorgerufen werden, oder ob es sich um tRNAs mit gleicher Basensequenz, aber unterschiedlichem Methylierungsmuster, handelt.

Dazu wurden die tRNAs zweidimensional gelelektrophoretisch analysiert nach einer in dieser Arbeit beschriebenen Modifikation der Methode von Fradin und Feldmann (1975). Gesamt-tRNA von *Dictyostelium* konnte dadurch in etwa 40 Flecken aufgetrennt werden. Die Zahl der spezifischen tRNAs in Eukaryonten beträgt 55 ± 5 (Gallo und Pestka 1970), sodaß einige tRNA-Spezies nicht voneinander getrennt werden können. Die Markierung der Zellen mit ^{32}P hat gezeigt, daß bereits nach 30 min. Entwicklung in Phosphatpuffer ein qualitativ gleiches Muster von neu synthetisierten tRNAs existiert, wie in vegetativen Zellen. Die schnelle Neusynthese ist überraschend, da die bisher beschriebenen Halbwertszeiten im Bereich von 40 - 60 Stunden liegen (Abelson et al. 1974, Schlegel et al. 1978). Bei der Markierung der tRNA mit Methyl- ^3H -Methionin und ^3H -Uridin konnte mit der verwendeten Methode im gesamten Preaggregationszeitraum keine Unterschiede in der Synthese und der Methylierung der tRNA festgestellt werden. Die Basenanalysen von Gesamt-tRNA, die während verschiedener Zeiten

der Entwicklung mit Methyl-³H-Methionin markiert worden war, ergaben jedoch Änderungen in der Synthese von methylierten Nukleosiden.

2-O-methyl-Ribothymidin (Tm) wird während der Entwicklung verstärkt synthetisiert, während die Synthese von Ribothymidin abnimmt. Das Auftreten von Tm könnte zumindest teilweise die Befunde von Dingermann erklären. Tm wurde bisher nur in lysinspezifischen tRNAs aus Rattenleber nachgewiesen (Gross et al. 1974). Ob die zusätzliche Methylierung an der Ribose einen Einfluß auf die Funktionen der tRNA in der Proteinsynthese ausübt, ist nicht bekannt.

Die zusätzlichen Änderungen in der Synthese anderer Nukleoside wie N₂²-Dimethyl-Guanosin, 7-methyl-Guanosin oder 2-O-methyl-Guanosin geben einen weiteren Hinweis, daß sich bei einigen tRNA-Spezies das Modifikationsmuster während der Entwicklung verändert.

Zusammen mit den Befunden der Trennung der Gesamt-tRNA auf Polyacrylamidgelen kann man zu dem Schluß kommen, daß sich die beobachteten Veränderungen der methylierten Nukleoside auf tRNA-Spezies beschränken, die im vegetativen und im differenzierten Stadium vorhanden sind. Die bisher verwendeten Methoden sind zu unsensibel, um tRNAs trennen zu können, die sich bei gleicher Primärsequenz nur in wenigen Methylgruppen unterscheiden. Ein Beweis der These wäre nur durch die Isolierung spezifischer tRNAs aus beiden Wachstumsstadien und Fingerprintanalysen der tRNAs zu erbringen.

Das Auftreten von tRNA-Isoakzeptoren mit gleicher Primärsequenz und unterschiedlichem Gehalt an modifizierten Basen - einschließlich der Ribosemethylierungen - ist für einige tRNAs beschrieben. So kommen z.B. im Rattenhirn sechs serinspezifische tRNAs vor, von denen sich drei tRNAs von den übrigen nur durch eine zusätzliche Ribosemethylierung am Guanosin in Position 17

unterscheiden. Auf den unterschiedlichen Gehalt von Ribothymidin in eukaryontischen tRNAs wurde bereits eingegangen (4.4.3.).

Die strukturellen Änderungen der Tertiärstruktur, die durch unterschiedliche Methylierungsgrade der tRNA hervorgerufen werden, beeinflussen die Funktion der tRNA am Ribosom.

Für die Methylgruppe des Ribothymidins konnte dieser Einfluß in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden. Bei der Analyse von tRNAs aus dem Cytoplasma und der polysomalen Fraktion von *Dictyostelium* wurden rT-haltige tRNAs in größerem Maße an den Polysomen gefunden (Dingermann, Pistel, Kersten 1979). Außerdem besitzt diese Methylgruppe einen Effekt auf die Fehlerrate des Proteinbiosynthesesystems von *E. coli* (Kersten et al. 1981).

Um die Frage der Änderung des Polyaminmusters während der verschiedenen Lebensstadien von *Dictyostelium* untersuchen zu können, wurde ein geeignetes Verfahren entwickelt, mit dem alle freien Polyamine und ihre bisher bekannten Derivate bestimmt werden konnten. Die Trennung basiert auf der stufenweisen Elution der Polyamine von einem Kationenaustauscherharz durch ein Natriumchlorid/Natriumcitrat Puffersystem. Für den automatischen Ablauf der Analysen wurde ein modifizierter Aminosäureanalysator eingesetzt. Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Picomol-Bereich.

Die Polyaminbestimmungen von *Dictyostelium* ergaben ein ungewöhnliches Muster: Die Zellen enthalten Putrescin und Spermidin in Konzentrationen, die vergleichbar sind mit denen anderer niederer Eukaryonten (10.6 mM Putrescin; 1.6 mM Spermidin). 1,3 Diaminopropan, das dritte vorkommende Amin, ist jedoch mit einer Konzentration von 7.0 mM außergewöhnlich hoch. Vergleichbare Mengen dieses

niederen Homologen des Putrescins wurden bisher nur in *Euglena gracilis* gefunden (Aleksijevic et al. 1979). Im Gegensatz zu *Dictyostelium* wird es in diesem Organismus an Stelle von Putrescin zur Synthese von Norspermidin und Norspermin - den entsprechenden Homologen von Spermidin und Spermin - verwendet.

In *Dictyostelium* kommen diese Verbindungen nicht vor. Während der frühen Entwicklungsphase verändert sich das Polyaminmuster der Zellen. Die Konzentrationen von Putrescin und Diaminopropan steigen - bezogen auf Protein - während der ersten 2 - 3 Stunden an und nehmen im weiteren Verlauf ab, während Spermidin von Beginn an sinkt. Unter der Voraussetzung, daß sich das Zellvolumen während der Entwicklung nicht ändert, betragen die intrazellulären Konzentrationen nach 8 Stunden Entwicklung 6 mM Putrescin, 0,6 mM Spermidin und 6 mM Diaminopropan. Der Anstieg von Diaminopropan und die Abnahme von Spermidin deuten auf einen erhöhten Umsatz von Spermidin zu Beginn der Differenzierung. Die Markierungsversuche mit ^3H -Spermidin in den verschiedenen Wachstumsstadien haben ergeben, daß Diaminopropan ein Abbauprodukt von Spermidin ist. Damit unterscheidet sich die Synthese nicht von *Euglena*. Einen Hinweis darauf, daß die Diaminopropankonzentration in der Zelle eine kritische Größe erreicht hat, gaben die Polyaminanalysen des Inkubationsmediums. Während des vegetativen Wachstums konnte im Medium kein Diaminopropan nachgewiesen werden. Während der Entwicklung werden jedoch größere Mengen in den Puffer abgegeben. Die Zelle verhindert so offenbar einen Anstieg von Diaminopropan. Während des vegetativen Wachstums wird die Konzentration durch die laufende Teilung der Zellen konstant gehalten. Im Entwicklungsstadium findet zwar weiterhin Polyaminsynthese statt (Turner u. North 1977), die Zellen teilen sich aber nicht mehr, so daß es ohne den Abbau oder die Ausschleusung von Diaminopropan zu einer Anhäufung in der Zelle kommen würde.

Die Funktion von Diaminopropan in Dictyostelium ist noch völlig unklar. In Zellen höherer Eukaryonten, in denen es physiologisch nicht existiert, ist es ein Hemmstoff der Ornithindecaboxylase (Alhonen-Hongisto et al. 1979). In Dictyostelium tritt nach den Befunden dieser Arbeit während der Entwicklung sowohl eine Veränderung der Methylierung der tRNA als auch der Polyaminkonzentration in der Zelle auf.

Da die bisher beschriebenen Methylierungssysteme - zumindest in vitro - abhängig sind von Polyaminen, könnte die beobachtete Verminderung der Polyamine die Veränderung des Methylierungsmusters der tRNA bewirken. Es wurde daher untersucht, welche Polyaminabhängigkeit die methylierenden Enzyme aus den verschiedenen Lebensphasen besitzen. Die in vitro Methylierung von E. coli IB-5 tRNA mit Enzymextrakten aus vegetativer Wachstumsphase und dem Entwicklungsstadium von Dictyostelium zeigt eine deutliche Polyaminabhängigkeit. Eine optimale Stimulierung der Reaktion wird durch 1 - 2 mM Spermidin und 10 mM Putrescin erreicht. Niedrigere und höhere Konzentrationen führen zu einem verminderten Einbau von Methylgruppen in die tRNA. Unterschiede in der Polyaminabhängigkeit zwischen den Enzymextrakten der verschiedenen Lebensstadien konnten nicht festgestellt werden. Da die Bildung von mehreren Produkten gemessen wurde, könnten durchaus Unterschiede in der Stimulierbarkeit verschiedener spezifischer Methylasen existieren, die sich in der Gesamtreaktion gegenseitig aufheben.

Dieser Frage wurde durch Produktanalysen nachgegangen. Die Verteilung der gebildeten Produkte durch die Enzyme aus den verschiedenen Lebensstadien unterscheiden sich signifikant, ebenso das Verhalten gegenüber verschiedener Polyaminmengen. Auf Grund der Komplexität der Reaktion ist eine exakte kinetische Erfassung der beteiligten Reaktionspartner nicht möglich. Daher kann nicht mit

Sicherheit bestimmt werden, welcher Effekt der Polyamine für die beobachtete Abhängigkeit verantwortlich ist. Polyamine können auf Grund ihres stark basischen Charakters an die tRNA binden und dort Konformationsänderungen hervorrufen (Quigley 1978, Bolton u. Kearns 1977, Sakai u. Cohen 1976). Dadurch könnten bestimmte Regionen des Moleküls besser zugänglich werden für die methylierenden Enzyme. Weiterhin wäre ein unspezifischer Kationeneffekt denkbar. Die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen zu diesem Problem deuten allerdings auf einen spezifischen Effekt am Enzym:

- 1) Durch Gleichgewichtsdialyse wurde festgestellt, daß die Polyamine in jedem Fall in hohem Überschuß gegenüber der tRNA sind.
- 2) Für Putrescin, dessen stimulierende Wirkung auf die Reaktion ebenso ausgeprägt ist, wie die von Spermidin, konnte kein Effekt auf die tRNA nachgewiesen werden.
- 3) Diaminopropan hat nur einen geringen Einfluß auf die enzymatische Reaktion. Dies spricht gegen einen unspezifischen Kationeneffekt.
- 4) In einem spezifischen prokaryontischen Methylierungssystem, mit einem Enzym aus *B. subtilis* (m^1A -Methylase) und einer *E. coli* tRNA als Substrat wurden veränderte Methylierungsoptima gefunden, die ebenfalls im physiologischen Bereich liegen. Putrescin, das in *B. subtilis* nicht vorkommt, zeigt auf diese Reaktion keinen Einfluß.
- 5) Auch in der Literatur existieren für die verschiedenen Systeme verschiedene optimale Stimulierungsbereiche (Leboy 1976).

Die Übertragung der in vitro Befunde auf die in vivo Verhältnisse ist bei der Methylierungsreaktion aus folgenden Gründen problematisch: Ein großer Teil der Modifikationen wird bereits auf der Stufe der Vorläufermoleküle der tRNA durchgeführt (Perry 1976, Altman 1978).

Die Vorläufermoleküle besitzen zusätzliche Polynukleotidketten am 3' und 5' Ende; eukaryontische pre-tRNAs können auch in der Anticodonschleife zusätzliche Sequenzen aufweisen. Dies führt in einigen Bereichen zu einer veränderten Tertiärstruktur des Moleküls gegenüber der reifen tRNA. Sequenzanalysen von Vorläufern der tRNAs für Tyrosin und Phenylalanin aus Hefe haben ergeben, daß in der pre-tRNA^{Tyr} die Modifikationen m^2G , m^2_2G und G_m , in der pre-tRNA^{Phe} m^2G und G_m nicht vorkommen, während alle übrigen Modifikationen bereits gebildet sind (Knapp 1978). Der große Anteil der Guanosinmethylierungen, den wir in vitro finden, könnte darauf beruhen, daß die Methylasen in diesem Fall die native tRNA als Substrat erkennen. Die vollständig ausgebildeten tRNA Moleküle sind demnach keine physiologischen Substrate der Methylasen. Es ist außerdem nicht bekannt, ob die Polyamine in der Zelle kompartimentiert vorkommen, und welche Menge frei verfügbar ist. Daher kann nichts darüber ausgesagt werden, welche der spezifischen in vitro Methylierungen unter annähernd physiologischen Bedingungen abläuft. Daß eine weitgehende Annäherung der in vitro Bedingungen an die in vivo Verhältnisse zu völlig neuen Ergebnissen führen kann, wurde in jüngster Zeit von Kurland für das Fehlersystem der Proteinbiosynthese von E. coli gezeigt (Jelenc u. Kurland 1979).

Um exaktere Aussagen machen zu können wurde deshalb die Methylierung von tRNA bei verschiedenen Polyaminkonzentrationen in vivo gemessen.

Verwendet wurden 2 Hemmstoffe, welche die Polyaminsynthese verschieden stark beeinflussen. α -Methyl-Ornithin, ein kompetitiver Hemmstoff der Ornithindecaboxylase, führt zu einer Verringerung der Putrescin- und Diaminopropankonzentration. Die Spermidinmenge in der Zelle liegt

jedoch über den Kontrollwerten. Diaminopropanol, der zweite verwendete Hemmstoff, hemmt die Synthese aller drei in Dictyostelium vorkommenden Polyamine.

Durch Bestimmung der Synthese und Methylierung von tRNA konnte gezeigt werden, daß die Methylierung während des vegetativen Wachstums proportional zur Polyaminmenge in der Zelle erfolgt. Die Bildung der tRNA wird durch die Hemmung der Polyaminsynthese nicht beeinflusst. Das Ausmaß der Hemmung der identifizierten Nukleoside liegt im Bereich von 20 - 40 %.

Am stärksten betroffen ist Ribothymidin.

In der tRNA wurden darüber hinaus 2 markierbare Nukleoside gefunden, deren Synthese absolut abhängig ist von der physiologischen Polyaminkonzentration. Da sowohl α -Methyl-Ornithin wie auch Diaminopropanol den gleichen Effekt erzielen, kann davon ausgegangen werden, daß die Verminderung des Polyaminspiegels für die Hemmung verantwortlich ist. Das chromatographische Laufverhalten der Nukleoside bei der HPLC-Analyse entspricht den beiden Purinen Guanosin und Adenosin. Bei den Versuchen, die Nukleoside näher zu charakterisieren wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1) Die Nukleoside sind durch ^3H -Methyl-Methionin und ^3H -Methyl-S-Adenosylmethionin markierbar.
- 2) Cytosin wird ebenfalls als Vorläufer eingebaut.
- 3) Die Trennung der Radioaktivität von den Purinen ist weder mit verschiedenen dünnschichtchromatographischen noch mit säulenchromatographischen Methoden möglich.
- 4) Bei HPLC-Analysen von Methyl- ^3H -Methionin markierter 16S und 23S RNA treten N_1 und N_2 ebenfalls auf.

Zusammenfassend kann man sagen, daß in dieser Arbeit gezeigt wird, daß sich während der Entwicklung von Dictyostelium das Methylierungsmuster der tRNA und der Gehalt der Polyamine Putrescin, Diaminopropan und Spermidin ändern. Die enzymkinetischen Untersuchungen der Methylierung in Abhängigkeit der physiologischen Polyamine und die Be-

stimmung der Methylierung von tRNA unter Polyaminmangel deuten auf eine kausale Abhängigkeit der Methylierung von der intrazellulären Polyaminkonzentration. Ergebnisse von Igarashi et al. (1979, 1981) scheinen diese Annahme zu bestätigen.

Die Autoren finden, daß in einer Polyaminabhängigen Mutante von *Escherichia coli* untermethylierte 16S RNA auftritt, wenn die Zellen ohne Polyamin im Medium gezüchtet werden. Wird dem Wachstumsmedium Putrescin zugesetzt, ist die 16S RNA normal modifiziert. Die Methylierung der 23S RNA zeigt keine Polyaminabhängigkeit.

Abdel Monem, M., Ohno, K., Fortuny, J. und Theologides, A.
(1975) Lancet 1210

Abdel Monem, M. (1978)

Advan. Chromatogr. 16, 249 - 251

Abelson, H., Johnson, L., Penman, S. und Grenn, H. (1974)
Cell 1, 161 - 165

Abraham, K. und Pihl, A. (1980)

Eur. J. Biochem. 106, 257 - 262

Agris, P. und Söll, D. (1977)

in: Nucleic Acid - Protein Recognition (Edited by H.J. Vogel)
P+S Biomedical Sciences Symposia Series, Academic Press
S. 321 - 344

Albani, M., Schmidt, W., Kersten, H., Geibel, K. und
Lüderwald, J. (1976)

FEBS Letters 70, 37 - 42

Albani, M. (1979)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Aleksijevic, A., Grove, J. und Schubert, F. (1979)

Biochim. Biophys. Acta 565, 199 - 207

Alhonen-Hongisto, L., Pösö, H. und Jänne, J. (1979)

Biochim. Biophys. Acta 564, 473 - 487

Ames, B. und Dubin, D. (1960)

J. Biol. Chem. 235, 769 - 757

Bachrach, U. (1973)

Function of Naturally Occuring Polyamines, Academic Press
New York

S. 15 - 23

Björk, G. und Jsakson, L. (1970)

J. Mol. Biol. 51, 83 - 100

Björk, G. und Neidhardt, F. (1975)
J. Bacteriol. 124, 99 - 111

Canellakis, E., Heller, J., Kyriakidis, D. und Chen, K. (1976)
in: Advances in Polyamin Research Vol. 1, Edited by R.
Campbell, Raven Press

Cashel, M. und Kalbacher, B. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 2309

Clark, B.F.C. (1978)
in: Transfer-RNA ed. S. Altman, Cell Monographie Series
The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England

McCloskey, J. und Nishimura, S. (1977)
Accounts of Chemical Res. 11, 403 - 410

Cohen, S., Morgan, S. und Streibel, E. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 669 - 672

Craddock, V.M. (1970)
Nature 228, 1264 - 1268

Davis, G., Gehrke, C. und Kuo, K. (1979)
J. Chrom. 173, 281 - 298

Dingermann, Th., Mach, M. und Kersten, H. (1979)
J. Gen. Microbiol. 115, 223 - 232

Dingermann, Th. (1980)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Dingermann, Th., Pistel, F. und Kersten, H. (1980)
Eur. J. Biochem. 104, 33 - 40

Eloranta, T., Mäenepää, P. und Raina, A. (1976)
Biochem. J. 154, 95 - 103

Fong, W., Heller, J. und Canellakis, E. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 885 - 892

Fradin, A., Gruhl, H. und Feldman, H. (1975)
FEBS Letters 50, 185 - 189

Gallo, R. und Pestka, S. (1970)
J. Mol. Biol. 52, 195 - 219

Gross, H., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K., Heckman, J.,
und RajBhandary, U. (1974)
Nucleic Acids Res. 1, 35 - 43

Hannonen, P., Raina, A. und Jänne, J. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 273, 84 - 90

Heady, J.E. und Kerr, S. (1975)
Cancer Res. 35, 640 - 643

Hoburg, A., Aschoff, H.J., Kersten, H., Manderschied, U.
und Gassen, H.G. (1979)
J. Bacteriol. 140, 408 - 414

Hölldt, E., Jänne, J. und Hori T. (1979)
Biochem. J. 178, 109 - 117

Hogan, B., Murden, S. und Blackledge, A. (1973)
in: Polyamines in Normal and Neoplastic Growth, ed. by
D.H. Russell, Raven Press S. 239 - 249

Jänne, J., Pösö, H. und Raina, A. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 473, 241 - 293

Jelenc, P.C. und Kurland, C.G. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3174 - 3178

Jgarashi, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Watanabe, W.,
Kogo, A. und Hirose S. (1979)
Eur. J. Biochem. 93, 345 - 353

Jgarashi, K., Kishida, K., Kashiwagi, K., Tatokoro, J.,
Kakegawa, T. und Hirose, S. (1981)
Eur. J. Biochem. 113, 587 - 599

Kersten, H., Raettig, R., Weissenbach, J. und Dirheimer, G.
(1978)
Nucleic Acids Res. 5, 3033 - 3042

Kersten, H., Albani, M., Männlein, E., Praisler, E., Wurmbach, P.
und Nierhaus, K. (1981)
Eur. J. Biochem. 114, 451 - 456

Kim, S.H., Quigley, G.J., Suddath, F., McPherson, A.,
Snedden, D., Kim, J.J., Weinzierl, J. und Rich, A. (1973)
Science 179, 285 - 288

Knapp, G., Beckman, J.S., Johnston, P.F., Furman, S.A.
und Abelson, J. (1978)
Cell 14, 221 - 236

Leboy, Ph. (1970)
Biochemistry 7, 1577 - 1583

Leboy, Ph. und Glick, J. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 435, 30 - 38

Loomis, W.F. (1975)
Dictyostelium discoideum, Academic Press New York

Mach, M. und Kersten, W. (1981)
J. Chromatogr. im Druck

Mamont, P., Böhlen, P., McCann, P., Bey, P., Schuber, F.
und Tardiff, Ch. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1626 - 1630

Marton, L.J. und Lee, P.L.Y. (1975)
Clin. Chem. 21/12, 1721 - 1724

McCann, P., Tardiff, Ch., Duchesne, M.C. und Mamont, P.
(1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 893 - 899

Menashe, M., Faber, J. und Bachrach, U. (1980)
Biochem. J. 188, 263 - 267

Menucci, L., Rojas, S. und Flessman Camargo, E. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 404, 249 - 256

Mitchell, J.L.A. und Rush, H.P. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 297, 503 - 516

- Morris, R.D. (1978)
in: Advances in Polyamin Research Vol.1, ed. A. Campbell,
Raven Press, New York
- Murao, K., Ishikura, H., Albani, M. und Kersten, H. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 1273 - 1287
- Nakada, D. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 103, 455 - 465
- Nau, F. (1974)
Biochemistry 13, 1105 - 1109
- Nau, F. (1976)
Biochimie 58, 629 - 645
- Nishimura, S. (1978)
in: Transfer-RNA, ed. S. Altman, Cell Monographic Series
The MIT Press, Cambridge, Mass. und London, England
- North, M. und Turner, R. (1978)
Microbios Letters 4, 221 - 228
- Ostermann, L.A. (1979)
Biochimie 61, 323 - 342
- Palatnik, C., Katz, E., Brenner, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 694 - 703
- Pegg, A.E. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 232, 630 - 642
- Perry, T.L., Hansen, S. und MacDougall, L. (1967)
J. Neurochem. 14, 775 - 782
- Perry, R.P. (1976)
Annual Review Biochemistry 45, 605 - 631
- Pett, D. und Ginsberg, H.S. (1968)
Fed. Proc. 27, 615 - 618

Pillinger, D. und Borek, E. (1969)

Biochemistry 62, 1145 - 1150

Pösö, H. und Jänne, J. (1976a)

Biochem. J. 158, 485 - 488

Pösö, H., Hannonen, P., Himberg, J.J. und Jänne, J. (1976b)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 227 - 234

Quigley, G., Teeter, M.M. und Rich, A. (1978)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 64 - 68

Raettig, R., Kersten, H., Weissenbach, J. und Dirheimer, G.
(1977)

Nucleic Acids Res. 4, 1769 - 1782

Randerath, E., Yu, C.T. und Randerath, K. (1972)

Anal. Biochem. 48, 172 - 198

Randerath, E., Chia, L.S., Morris, H.P. und Randerath, K. (1979)

Cancer Res. 34, 643 - 653

Rhajibhandary, U., Silberklang, M. und Gillum, A. (1979)

Methods in Enzymology LIX, 58 - 109

Roe, B.A. und Tsen, H.Y. (1977)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3696 - 3700

Rogg, H., Brambilla, R., Keith, G. und Staehlin, M. (1976)

Anal. Biochem. 48, 172 - 198

Rummel, K. (1977)

Diplomarbeit, Universität Erlangen -Nürnberg

Russel, D.H., Levy, C.C., Schimpf, S.C. und Hawk, J.A. (1971)

Cancer Res. 31, 1555 - 1558

Russel, D.H., Durie, B.G. und Salmon, S.E. (1975)
Lancet 2, 797 - 799

Russel, D.H. und Durie, B.G. (1978)
in: Progress in Cancer Research and Therapy Vol. 8, Raven
Press, New York

Sakai, T.T. und Cohen, S.S. (1976)
Prog. Natl. Acad. Sci. USA 17, 15 - 39

Sakai, T.T., Hovi, Ch., Kano, K. und Oka, T. (1979)
Biochemistry 18, 5541 - 5548

Schlegel, A.A., Jversen, P. und Rechsteiner, M. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 3715 - 3729

Schmidt, W. (1977)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Schmidt, W., Kersten, H. und Schweiger, H.J. (1977)
In: Progress in Acetabularia Research, ed. C.L.F. Woodcock
Academic Press, New York, San Francisco, London

Schreier, A.A. und Schimmel, P.R. (1975)
J. Mol. Biol. 93, 323 - 329

Seiler, N., Al-Therib, M.J. und Knödgen, B. (1973)
Hoppe Seylér's Z. Physiol. Chem. 354, 589 - 590

Seiler, N. und Al-Therib, M.J. (1974)
Biochem. J. 144, 29 - 35

Seiler, N. (1977)
Clin. Chem. 23, 1519 - 1522

Seiler, N. und Knödgen, B. (1979)
J. Chromatogr. 164, 155 - 168

Singer, B. und Kröger, L. (1979)
Prog. Nucl. Acid. Res. 13, 151 - 191

Swiatek, K.R., Streeter, D.G. und Simon, L.N. (1971)
Biochemistry 10, 2563 - 2567

Tabor, C.W. und Dobbs, L.G. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 2086 - 2091

Tabor, C.W. und Tabor, H. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 285 - 306

Turner, R. und North, M. (1977)
in: Developments and Differentiation in the Cellular Slime
Moulds, Capuccinelli und Ashworth Editors, Elsevier/Holland
S. 221 - 229

Wildenauer, D., Gross, H.J. und Riesner, D. (1974)
Nucleic Acids Res. 1, 1165 - 1182

Frau Professor Dr. H. Kersten danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und die durch ständige Diskussionsbereitschaft mögliche intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. W. Kersten danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut und für die großzügige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Frau Liselotte Mutschler bedanke ich mich für die wertvolle technische Unterstützung bei den Polyaminanalysen.

Für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Anregungen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts.

Lebenslauf

Am 13.9.1948 wurde ich, Michael Mach, als zweites Kind von Karl Mach und seiner Ehefrau Wilhelmine, geborene Prinke, in Coburg geboren.

Von 1954 - 1958 besuchte ich die Pestalozzi Schule in Coburg und von 1958 - 1968 das Gymnasium Casimirianum in Coburg, wo ich am 23.7.1968 das Abitur ablegte.

Von Oktober 1968 - September 1969 arbeitete ich in der Rats-Apotheke in Lichtenfels und von Oktober 1969 - März 1971 in der Margarethen-Apotheke in Brannenburg als Apothekerpraktikant. Am 10.9.1970 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung in München.

Im Wintersemester 1972 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Pharmazie, das ich am 5.5.1977 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 1.6.1977 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Die vorliegende Arbeit wurde seit Juli 1977 in der Arbeitsgruppe Biochemie unter der Leitung von Frau Professor Dr. H. Kersten durchgeführt.

